

**Systemische Gentherapie rheumatoider Arthritis in der Maus
durch RNA-Interferenz-abhängige Inhibierung
des inflammatorischen Signalmediators TAK1**

Der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Virginia Seiffart
aus Bad Harzburg

1. Referent:
2. Referent:
eingereicht am:
mündliche Prüfung (Disputation) am:

Privatdozent Dr. Gerhard Gross
Professor Dr. Jürgen Wehland
14.11.2009
27.02.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Poster

1. Courties, G., **Seiffart, V.**, Apparailly, F., Escriou, V., Scherman, D., Hoffmann, A., Gross, G., Jorgensen, C. (2008): TAK1 is a central mediator in rheumatoid arthritis. European Workshop for Rheumatology Research (EWRR), Toulouse
2. Courties, G., **Seiffart, V.**, Escriou, V., Scherman, D., Hoffmann, A., Jorgensen, C., Gross, G., Apparailly, F. (2008): RNAi-based therapy to target TAK1 in rheumatoid arthritis. Workshop on the immune-mediated inflammatory diseases (London)
3. **Seiffart, V.**, Laggies, S., Hoffmann, A., Apparailly, F., Courties, G., Zietara, N., Jablonska-Koch, J., Weiß, S., Jorgensen, C., Gross, G. (2008): A Systemic Gene Therapy Approach for the Inhibition of TAK1 by siRNA Interferes with Arthritis in a Mouse Model. Hannover Biomedical Research School (HBRS), Goslar

Tagungsbeiträge

4. Courties, G., **Seiffart, V.**, Escriou, V., Scherman, D., Hoffmann, A., Jorgensen, C., Gross, G., Apparailly, F., (2008): RNAi-based therapy to target TAK1 in rheumatoid arthritis. XVI Annual Meeting of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) in Brugge, Belgium
5. Courties, G., **Seiffart, V.**, Escriou, V., Scherman, D., Hoffmann, A., Jorgensen, C., Gross, G., Apparailly, F., (2008): In vivo silencing of TGF- β activating kinase 1: a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology (ACR), San Fransico
6. **Seiffart, V.**, Hoffmann, A., Apparailly, F., Courties, G., Jorgensen, C., Gross, G., (2007): Inhibition Of TGF- β activated kinase 1 (TAK1) By siRNA Ameliorates Arthritis In Mice. PHD Retreat der Helmholtz International Research School for Infection Biology (HIRSIB), Braunschweig

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
-----------------------------	---

Tabellenverzeichnis	VI
---------------------------	----

1 Einleitung	1
---------------------------	----------

1.1 Entzündung	1
1.2 Rheumatoide Arthritis	2
1.2.1 Die Ätiopathogenese	3
1.2.2 Zelluläre Infiltration in das rheumatoide Synovium	4
1.2.3 Zytokine in der rheumatoiden Arthritis	6
1.2.4 Die Rolle von T-Zellen in der rheumatoiden Arthritis	8
1.2.5 Makrophagen und ihre Effektorzytokine in der rheumatoiden Arthritis	11
1.2.6 Gewebedegradation in der rheumatoiden Arthritis	12
1.2.7 Signalweiterleitung in der rheumatoiden Arthritis.....	14
1.3 Kollagen-induzierte Arthritis	17
1.4 Therapien für die rheumatoide Arthritis	18
1.4.1 Zytokin-basierte Therapien	19
1.4.2 Signaltransduktionswege als therapeutische Ziele.....	20
1.4.3 Weitere therapeutische Ziele in der rheumatoiden Arthritis.....	21
1.4.4 Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung von rheumatoider Arthritis.....	22
1.5 siRNA für die Gentherapie in Arthritis	24
1.6 TAK1 als therapeutisches Ziel?	26
1.7 Ziel der Arbeit	29

2 Material und Methoden.....	30
-------------------------------------	-----------

2.1 Molekularbiologie	30
2.1.1 Isolierung von RNA	30
2.1.2 cDNA-Synthese	30
2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung von DNA	33
2.1.5 Agarosegel-Elektrophorese	34
2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
2.2 Mikrobiologie.....	34
2.2.1 Lösungen und Medien.....	34
2.2.2 Bakterienstämme.....	35

2.2.3	Transformation von kompetenten Zellen mittels Elektroporation.....	35
2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit dem JETSTAR-System®.....	35
2.3	Allgemeine proteinchemische Methoden.....	36
2.3.1	Isolierung von Proteinen	36
2.3.2	Isolierung von Proteinen mit dem TRI-Reagent®	36
2.3.3	BCA-Proteinbestimmung.....	37
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	37
2.3.5	Western Blot	38
2.4	Tierische Zellkultur.....	40
2.4.1	Lösungen und Medien.....	40
2.4.2	Zelllinien	41
2.4.3	Kulturbedingungen.....	41
2.4.4	Passagieren von Zellen.....	41
2.4.5	Einfrieren von Zellen	42
2.4.6	Auftauen von Zellen.....	42
2.4.7	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	42
2.4.8	Stimulation mit Zytokinen	44
2.4.9	NFκB-Reportertest	45
2.4.10	Durchflusszytometrie	45
2.5	Lentiviren	48
2.5.1	Retroviraler Gentransfer	48
2.5.2	Regulation der Transgenexpression: Das Tet-System	49
2.5.3	Lösungen und Medien.....	51
2.5.4	Herstellung von Lentiviren	51
2.5.5	Titerbestimmung	52
2.5.6	Infektion von C3H10T½ – Zellen.....	52
2.6	Kollagen-induzierte Arthritis (CIA).....	53
2.6.1	Immunisierung mit bovinem Kollagen II.....	53
2.6.2	Beurteilung der Arthritis bei Mäusen.....	54
2.6.3	Intravenöse Injektion von Lipoplex-siRNA Komplexen.....	55
2.6.4	Euthanasie	55
2.6.5	Zytokin und Anti-Kollagen II-Untersuchungen.....	56
3	Ergebnisse	59

3.1	Einfluss der TAK1-Inhibition/Inaktivität auf die inflammatorische Signaltransduktion <i>in vitro</i>	59
3.1.1	TAK1-Inaktivierung interferiert mit MAPK- und NFκB-Signalwegen in murinen mesenchymalen Progenitorzellen (C3H10T½)	59
3.1.2	Inhibition der TAK1 Expression durch siRNA.....	63
3.1.3	Einfluss der siRNA-abhängigen TAK1-Inhibition auf die MAPK-Signalwege in einer murinen Makrophagenzelllinie (J774.1).....	64
3.2	Einfluss der Inhibierung von TAK1 in einem Kollagen-induzierten Arthritis-Modell	66
3.2.1	siRNA-abhängige anti-TAK1-Strategie zur kurativen Behandlung von arthritischen DBA/1-Mäusen	66
3.2.2	Die Inhibierung von TAK1 reduziert Pfotenschwellung und Häufigkeit von Kollagen-induzierter Arthritis.....	67
3.2.3	Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf das Th1/Th2-Gleichgewicht und die T-Zellproliferation in Kollagen-induzierter Arthritis	75
3.2.4	Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die T-Zellantwort bei Kollagen-induzierter Arthritis.....	79
3.2.5	Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die lokale und systemische Zytokinexpression bei Kollagen-induzierter Arthritis	80
3.2.6	Inhibierung der TAK1- und der Zytokin-Expression durch die siTAK1-Behandlung in der Milz.....	84
3.2.7	Reduktion der TAK1 Expression in CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -Zellen der Milz	86
3.2.8	Beeinflussung der Zytokin-Expression von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen in der Milz durch die Inhibierung von TAK1	88
3.2.9	Reduktion der TAK1-Expression in CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -Zellen der Lymphknoten	90
3.2.10	Beeinflussung der Zytokin-Expression von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Zellen in den Lymphknoten durch die Inhibierung von TAK1	92
4	Diskussion	94
4.1	Gentherapeutische Strategien.....	94
4.1.1	siRNAs zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen	94
4.1.2	Viral basierte Inhibierung von TAK1	96
4.2	Welche Vorteile bietet eine anti-TAK1 Strategie gegenüber anderen Signalmolekülen?.....	97
4.2.1	TAK1 im Vergleich zu p38 und NFκB.....	97
4.3	Therapie der rheumatoiden Arthritis mit Hilfe einer anti-TAK1 Strategie.....	99
4.3.1	Kurative Behandlung von Arthritis im Tiermodell.....	99

4.3.2	T-Zellen als Effektoren der siTAK1 Therapie	100
4.3.3	Die Inhibition von TAK1 moduliert die Zytokin-Expression in rheumatoider Arthritis	102
4.4	TAK1 und die Geweberegeneration.....	104
4.5	Hat die TAK1-Therapie zur Behandlung rheumatoider Arthritis eine Realisierungschance bei Menschen?.....	106
5	Zusammenfassung.....	108
6	Anhang	109
6.1	Geräte	109
6.2	Verbrauchsmaterialien	109
6.3	Chemikalien und Enzyme	110
6.4	Kits und Standards	110
6.5	Oligonukleotidprimer	111
6.6	Verwendete Plasmide und Vektorkarten.....	111
6.7	Verwendete Computerprogramme / Datenbanken (Internet).....	114
6.8	Abkürzungsverzeichnis	114
	ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay	115
7	Literaturverzeichnis.....	118
	Danksagung.....	132
	Lebenslauf	133

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Rheumatoide Veränderungen an der Hand.	2
Abbildung 1-2	Pathogenese der rheumatoiden Arthritis.	3
Abbildung 1-3	Schematische Darstellung eines normalen Gelenks und seine Veränderung in der rheumatoiden Arthritis.	5
Abbildung 1-4	Zytokin-Netzwerk in der rheumatoiden Arthritis.	7
Abbildung 1-5	Aktivierung von synovialen T-Zellen in der rheumatoiden Arthritis und ihre Schlüsselwirkungen.	10
Abbildung 1-6	Regulation der Aktivierung von Chondrozyten und der Knorpeldegradation in rheumatoider Arthritis.	13
Abbildung 1-7	Überblick über IL-1 und TNF induzierte MAPK und NFκB Signalwege.	15
Abbildung 1-8	Pathophysiologie der Kollagen-induzierten Arthritis.	18
Abbildung 1-9	Schematische Darstellung verschiedener Gentransfermethoden.	22
Abbildung 1-10	Signalwege der TGF-β-aktivierten Kinase 1 (TAK-1).	26
Abbildung 2-1	Schematische Darstellung der Apparatur für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS).	46
Abbildung 2-2	Herstellung rekombinanter Retroviren (retrovirale Vektoren) mit Hilfe von Verpackungszellen.	49
Abbildung 2-3	rtTA/tTS basiertes Tet-On System.	50
Abbildung 2-4	Arthritische Hinter- und Vorderpfoten von Collagen II immunisierten Mäusen.	54
Abbildung 3-1	Einfluss der Inaktivität von TAK1 auf IL-1 induziertes MAPK Signaling in murinen mesenchymalen Vorläuferzellen (C3H10T½).	60
Abbildung 3-2	Einfluss der Aktivität von TAK1 auf IL-1 induziertes NFκB Signaling in murinen mesenchymalen Vorläuferzellen (C3H10T½).	61
Abbildung 3-3	Einfluss von dnTAK auf die Zytokin-abhängige Aktivierung eines NFκB-Luziferase Reportersystems.	62
Abbildung 3-4	Inhibition der TAK1 Expression in vitro.	63
Abbildung 3-5	Einfluss der Inhibition von TAK1 auf TNFα induziertes MAPK Signaling in murinen Makrophagen (J774.1).	64
Abbildung 3-6	Einfluss der Inhibition von TAK1 auf LPS induziertes MAPK Signaling in murinen Makrophagen (J774.1).	65
Abbildung 3-7	Zeitschema eines kurativen Versuchsansatzes für Kollagen-induzierte Arthritis.	66
Abbildung 3-8	Kollagen-induzierte Arthritis in DBA/1 Mäusen.	67
Abbildung 3-9	Therapeutischer Effekt einer TAK1 spezifischen siRNA Behandlung auf die Pfotenschwellung in Kollagen-induzierter Arthritis.	68
Abbildung 3-10	Therapeutischer Effekt einer TAK1 spezifischen siRNA Behandlung auf die Pfotenschwellung in Kollagen-induzierter Arthritis.	69
Abbildung 3-11	Therapeutischer Effekt einer TAK1 spezifischen siRNA Behandlung auf die Pfotenschwellung in Kollagen-induzierter Arthritis.	70
Abbildung 3-12	Therapeutischer Effekt einer TAK1 spezifischen siRNA Behandlung auf die Entzündung in Kollagen-induzierter Arthritis.	72
Abbildung 3-13	Therapeutischer Effekt einer TAK1 spezifischen siRNA Behandlung auf die Entzündung in Kollagen-induzierter Arthritis.	73
Abbildung 3-14	Einfluss der siTAK1 Behandlung auf die Häufigkeit (Inzidenz) von Kollagen-induzierter Arthritis.	74
Abbildung 3-15	Einfluss der siTAK1 Behandlung auf das IgG2a/IgG1 Verhältnis im Verlauf der Arthritis.	76
Abbildung 3-16	Einfluss der Inhibition von TAK1 auf die Kollagen II spezifische T-Zell Proliferation in Kollagen-induzierter Arthritis.	78
Abbildung 3-17	Einfluss der siTAK1 Behandlung auf die T-Zellantwort in Kollagen-induzierter Arthritis.	79

<i>Abbildung 3-18</i>	Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die TNF α Produktion in verschiedenen Organen von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis.	80
<i>Abbildung 3-19</i>	Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die IFN γ Produktion in verschiedenen Organen von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis.	81
<i>Abbildung 3-20</i>	Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die IL-6 Produktion in verschiedenen Organen von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis.	82
<i>Abbildung 3-21</i>	Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die IL10 Produktion in verschiedenen Organen von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis.	82
<i>Abbildung 3-22</i>	Einfluss der siTAK1 Behandlung auf die lokale Zytokinsekretion in Kollagen-induzierter Arthritis.	84
<i>Abbildung 3-23</i>	Inhibition von TAK1 in der Milz von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis.	85
<i>Abbildung 3-24</i>	Einfluss der TAK1 Inhibition auf die Zytokinexpression in der Milz arthritischer Mäuse.	86
<i>Abbildung 3-25</i>	Einfluss der siRNA gegen TAK1 auf die Expression von TAK1 in verschiedenen, aus der Milz isolierten Zelltypen.	87
<i>Abbildung 3-26</i>	Beeinflussung der Zytokinexpression von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen durch die Inhibierung von TAK1.	89
<i>Abbildung 3-27</i>	Einfluss der siTAK1 Behandlung auf die TAK1 Expression in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen der Lymphknoten arthritischer Mäuse.	91
<i>Abbildung 3-28</i>	Einfluss der TAK1 Inhibition auf die Zytokinexpression in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen der Lymphknoten arthritischer Mäuse.	92
<i>Abbildung 6-1</i>	Vektorkarte für pLOX.	113

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1-1</i>	Schlüsselzytokine und ihre Funktionen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis.	6
<i>Tabelle 1-2</i>	Ausgewählte Zytokine als therapeutische Ziele in der rheumatoiden Arthritis.	19
<i>Tabelle 1-3</i>	Eigenschaften von viralen Vektoren, die für die Gentherapie genutzt werden.	23
<i>Tabelle 2-1</i>	Prädisposition verschiedener Mausstämme für CIA.	53
<i>Tabelle 2-2</i>	Visuelles Punktesystem zur Bewertung der Ausprägung von Arthritis in CIA-Modellen bei Nagetieren.	54
<i>Tabelle 6-1</i>	Verwendete Enzyme.	110
<i>Tabelle 6-2</i>	Verwendete Kits und Standards.	110
<i>Tabelle 6-3</i>	Verwendete murine Primer für RT-PCR und qPCR.	111
<i>Tabelle 6-4</i>	Verwendete Plasmide.	111

1 Einleitung

1.1 Entzündung

Allen entzündlichen Krankheiten, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, liegt eine Entzündungsreaktion zugrunde. Entzündungen/Inflammation (*lat. inflammatio*) dienen als eine Reaktion des Körpers und des Immunsystems dem Schutz vor Infektionen und äußeren Schädigungen und sind damit für das Überleben eines Organismus unabdingbar. Gerät jedoch der Ablauf einer Entzündungsreaktion des Körpers aus dem Gleichgewicht oder wird durch einen genetischen Defekt gestört, kann dies zu schwerer Krankheit und sogar zum Tod führen. Innerhalb der Entzündungsreaktion kommt es zu spür- und sichtbaren Symptomen, die bereits im ersten Jahrhundert A.D. durch Celsus beschrieben wurden und als die Celsusschen Kardinalsymptome bekannt sind. Es handelt sich um die vier charakteristischen Zeichen Rötung (*lat. rubor*), Überwärmung (*lat. calor*), Schwellung (*lat. tumor*) und Schmerz (*lat. dolor*). Diese wurden im 3. Jahrhundert AD von Galen durch ein fünftes, die eingeschränkte Funktion (*lat. functio laesa*), ergänzt (E'Silva, 1994).

Kritisch für den Ablauf einer Entzündung ist die Möglichkeit, die Immunantwort wieder anzuhalten, nachdem die Noxe (der schädigende Reiz) beseitigt wurde, um eine Schädigung des eigenen Gewebes zu verhindern. Diese Selbstregulation basiert auf pro- und anti-inflammatorischen Signalen. Häufig kommen die ersten Antworten auf eine inflammatorische Reaktion von residenten Mastzellen und Makrophagen innerhalb eines Gewebes (Nathan, 2002). Diese setzen nach Stimulation eine Vielfalt an pro-inflammatorischen Faktoren, inklusive Zytokine und Chemokine, frei. Die primären Moleküle, die die Produktion von Zytokinen und anderen Proteinen der Entzündungsantwort steuern, sind mikrobielle Produkte (z.B. Lipopolysaccharid, LPS) und die Hauptzytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-1, IL-17 und IL-18 selber. Diese binden an eine Reihe von Zelloberflächenrezeptoren und aktivieren eine Anzahl von intrazellulären Signalwegen. Diese wiederum sind für die Regulation der Expression von Genen der Entzündungsantwort verantwortlich (Kracht, et al., 2002). Durch die Stimulation der Signalkaskaden kommt es zur Aktivierung und Migration von Leukozyten (Neutrophile, Monozyten und Eosinophile) aus dem venösen System zum Ort der Schädigung, zur Koagulation, einem Zusammenbruch oder der Verflüssigung des Gewebes und der Zerstörung von Matrix (Mohammed, et al., 2003). Homöostase und Gesundheit werden wieder hergestellt, wenn die Entzündung durch eine anti-inflammatorische Antwort limitiert wird (Tracey, 2002). Eine Kontrolle dieser Reaktion ist notwendig, da eine falsche Regulation der Antwort zu entzündlichen Krankheiten führen und einen Immundefekt (Immundefizienz) zur Folge haben kann (Mohammed, et al., 2003).

Die Einteilung von Entzündungsreaktionen erfolgt gemäß ihrem zeitlichen Ablauf in akut oder chronisch und nach ihrer Ausdehnung in lokal oder systemisch (Arnheim, et al., 1994). Wird eine akute lokale Entzündung zu einer körperweiten Antwort, die außer Kontrolle gerät, kann sie zu einem erheblichen Organausfall und sogar zum Tod führen (Weiss, 2002). So gibt es viele Krankheiten, die durch eine chronische Entzündung charakterisiert sind, obwohl es keinen erkennbaren, auslösenden Reiz gibt. Beispiele hierfür sind die rheumatoide Arthritis,

Multiple Sklerose oder die chronische Darmentzündung. Diese Krankheiten werden durch autoimmunologische Mechanismen initiiert und erhalten (Kracht, et al., 2002).

Die rheumatoide Arthritis stellt ein bedeutendes Paradigma einer systemischen Autoimmunerkrankung dar. Wie im Folgenden noch erläutert wird, besteht eine Notwendigkeit in der Entwicklung neuer Therapiestrategien, was zum Thema dieser Arbeit wurde.

1.2 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung, charakterisiert durch den symmetrischen Befall mehrerer diarthrodialer (frei beweglicher) Gelenke. Mit einer Prävalenz von 1-3% der Bevölkerung handelt es sich um eine der häufigsten Bindegewbserkrankungen, deren Ätiologie, d.h. deren Krankheitsursachen, noch nicht vollständig geklärt ist (Sweeney, et al., 2004; Harris, 1990).

Der Krankheitsausbruch erfolgt üblicherweise in einem Alter zwischen 30 und 55 Jahren, wobei die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung bei Frauen doppelt so hoch ist. Aus noch ungeklärter Ursache werden dabei körpereigene Strukturen als fremd erkannt und es findet eine Immunreaktion gegen körpereigenes Gewebe statt. Klinisch manifestiert sich die Krankheit als eine symmetrische Polyarthritits, in deren Verlauf es zu einer Entzündung der Gelenkinnenhaut (Synovium) kommt. Knochen und Knorpel im Gelenk werden angegriffen und abgebaut, was mit erheblichen Schmerzen und Deformationen einhergeht und initial häufig zunächst in den Gelenken von Händen und Füßen auftritt (Abbildung 1-1) (Bernhard, et al., 2001).

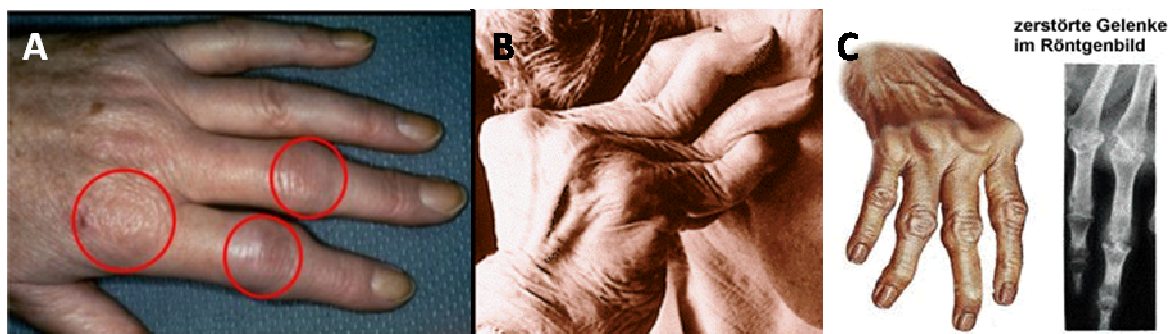


Abbildung 1-1 | *Rheumatoide Veränderungen an der Hand.* Die chronische Entzündung der metacarpophalangealen Gelenke führt zur Deformation der Hände mit einer Deviation der Finger.

Das Gelenk ist das Hauptziel der pathologischen Immunantwort, aber bei einer weit fortgeschrittenen Krankheit können auch viele andere Organe in Mitleidenschaft gezogen werden. Systemische Manifestationen, verursacht durch die Grundkrankheit und/oder Folgen der notwendigen therapeutischen Immunsuppression, wie Infektionen, subkutane Knoten, Rippenfellentzündung, Lederhautentzündung, Herzbeutelentzündung, Entzündung der Blutgefäße und ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen tragen zur Morbidität und Mortalität bei langanhaltender Krankheit bei (Sweeney, et al., 2004; Turesson, et al., 2007). Statistisch gesehen ist die Lebenserwartung von Personen mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zur Normalbevölkerung um 5-10 Jahre vermindert (Bernhard, et al., 2001).

Bei Auslösung und Chronifizierung spielen eine Vielzahl von genetischen und nicht-genetischen Faktoren (Umwelteinflüsse, infektiöse Agenzien) eine Rolle. Generell kommt es durch verschiedene Prozesse der spezifischen und unspezifischen Immunantwort zur klinischen Manifestation der rheumatoiden Arthritis.

Im Folgenden werden einige für diese Arbeit essentielle Aspekte der komplexen Pathogenese der rheumatoiden Arthritis sowie derzeitige und neue Strategien zur Therapie näher erörtert.

1.2.1 Die Ätiopathogenese

Die Ätiologie (Krankheitsursache und -auslösung) bzw. die komplette Pathogenese (Entstehung und Verlauf der Krankheit) der rheumatoiden Arthritis ist, wie bereits erwähnt, noch nicht vollständig geklärt (Firestein, 2003). Hypothesen über mögliche Ursachen müssen verschiedene Charakteristika der Krankheit berücksichtigen wie Autoimmunität, chronische Entzündung und die Gelenkzerstörung (Abbildung 1-2, S.3). Mit zunehmender Kenntnis über die beteiligten Zelltypen, Antigene und Mediatoren der Krankheit konnten mehrere Faktoren, die zum Krankheitsbild beitragen, identifiziert werden (Wahle, et al., 1999; McInnes, et al., 2007).

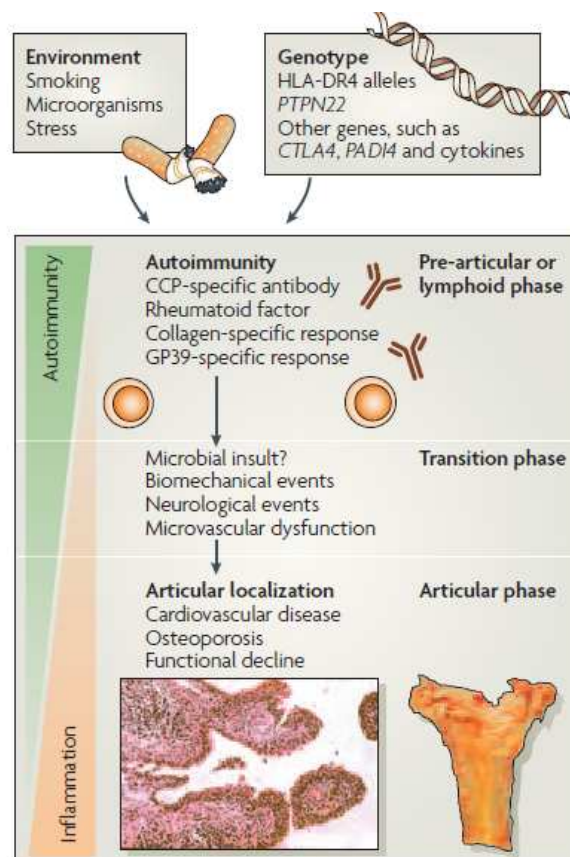


Abbildung 1-2 | Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. Autoimmunprozesse können Jahre vor dem klinischen Auftreten der Krankheit nachgewiesen werden und präsentieren die prä-artikuläre oder lymphoide Phase der Krankheit. Der Übergang in die artikuläre Phase, die mit der klinischen Manifestation der Krankheit einhergeht, wird durch krankheitsbezogene Prozesse, wie biomechanische und/oder neurologische Ereignisse initiiert. Anschließend erfolgt die entzündliche Pathogenese, die zur Gelenkzerstörung führt und die Komorbidität, einschließlich Herz-Kreislauf-erkrankungen und Osteoporose, erhöht. Mit fortschreitender Krankheit verschieben sich autoimmunologische mehr zu entzündlichen Prozessen. Weitere Erläuterungen sind im Text beschrieben (McInnes, et al., 2007).

Basierend auf der Entdeckung, dass Immunglobuline, Immunkomplexe, B- und T-Zellen eine wichtige Rolle in der rheumatoiden Arthritis spielen, wurden Immunmechanismen als primäre Reaktionen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis postuliert (Waßmuth, 1994). Die Autoimmunität manifestiert sich durch die Produktion von Antikörpern spezifisch für IgG (bekannt als Rheumafaktoren) oder für zyklische, citrullinierte Peptide (CCP). Letztere enthalten die Aminosäure Citrullin, die post-translational durch Peptidylarginin-Deaminasen gebildet wird (McInnes, et al., 2007). Weitere Autoantigene in der rheumatoiden Arthritis sind Kollagen II (Steffen, 1970) und das Knorpel-Glykoprotein-39 (gp-39) (Verheijden GF, 1997).

Die gängige Arbeitshypothese ist, dass ein unbekanntes Antigen mit einem Tropismus für Gelenke auf dem Blutweg zum Synovium gelangt und dort durch antigen-präsentierende Zellen (APC) mit Hilfe von HLA-Molekülen den T-Lymphozyten präsentiert wird. Die Interaktion zwischen den APC und dem passenden Rezeptor der T-Lymphozyten (TCR) führt zu einer Zellaktivierung, wodurch es zu einer klonalen Expansion von spezifischen T-Lymphozyten kommt. Durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine von den aktivierten T-Zellen sowie die Aktivierung anderer Zellen wie Makrophagen und Fibroblasten wird eine komplexe Sequenz von immunologischen und entzündlichen Prozessen ausgelöst (Bernhard, et al., 2001; Wahle, et al., 1999). Die Mechanismen, durch die die T- und B-Zell-Toleranz gebrochen wird, sind noch nicht gut verstanden (McInnes, et al., 2007).

Eine Anhäufung von CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) im rheumatoiden Synovium zu Beginn der Krankheit sowie die Entdeckung, dass Schweregrad und Rheumatiter mit der Anwesenheit von bestimmten HLA-Molekülen (HLA-DR4 und -DR1) korrelieren, stellte die T-Lymphozyten als Trigger in den Vordergrund. CD4⁺ T-Zellen werden durch HLA-Moleküle der Klasse II (z.B. HLA-DR, -DQ) aktiviert (Lang, 1991). Die HLA-Determinanten HLA-DR4 und -DR1 treten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis gehäuft auf und weisen eine Sequenzhomologie für eine bestimmte Aminosäuresequenz in der β -Kette des HLA-Komplexes auf, das sogenannte „shared epitope“ (Waßmuth, 1994; McInnes, et al., 2007). Neben den HLA-Allelen gibt es noch einige andere genetische Loci, die mit Schweregrad und Anfälligkeit für die rheumatoide Arthritis assoziiert werden, u.a. für verschiedene Zytokine und Zytokinrezeptor-Loci, z.B. für TNF, IL-1, IL-10 und IL-18 (van der Helm-van Mil, et al., 2005).

Umweltfaktoren haben ebenfalls einen Einfluss auf Auslösung, Verlauf und Schwere der Krankheit. Neben der Beteiligung von zahlreichen, infektiösen Organismen scheint Rauchen ein wichtiger Risikofaktor in HLA-DR4-positiven Individuen zu sein (Klareskog, et al., 2007), da es die Citrullinierung von körpereigenen Proteinen fördert.

1.2.2 Zelluläre Infiltration in das rheumatoide Synovium

Nach Aktivierung der Immunantwort kommt es zur klinischen Manifestation der rheumatoiden Arthritis. Diese äußert sich in einer Entzündung der Gelenkinnenhaut (Synovium, *Membrana synovialis*), was als Synovitis bezeichnet wird. Das normale Synovium ist eine relativ azelluläre Struktur, deren innere Membran aus makrophagen- und fibroblastenähnlichen Zellen, den Synoviozyten, besteht. Durch die verstärkte Proliferation der Synoviozyten und der Einwanderung von Immunzellen kommt es zur Hyperplasie (Gewebevergrößerung) des Syn-

1. Einleitung

oviums und damit zur Bildung eines Pannus (Abbildung 1-3). Als Pannus wird eine Bindegewebswucherung bezeichnet, die von der Gelenkkapsel ausgehend in den Gelenkspalt vorwächst und zur völligen Funktionseinbuße führen kann.

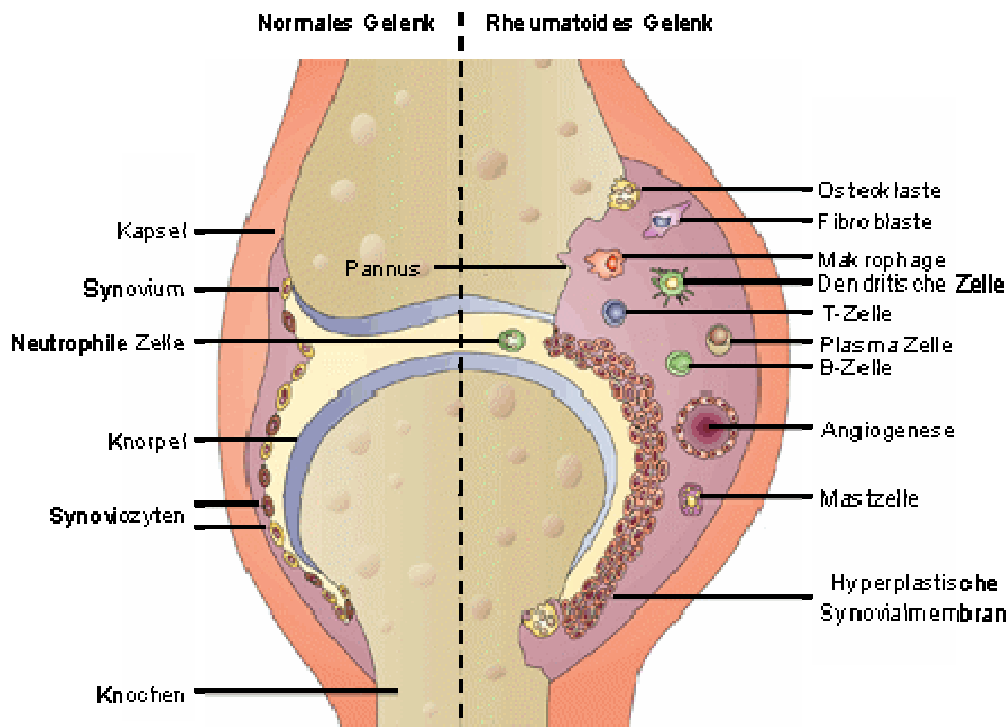


Abbildung 1-3 | Schematische Darstellung eines normalen Gelenks und seine Veränderung in der rheumatoiden Arthritis. A | Ein synoviales Gelenk besteht aus den beiden Enden der Gelenkknochen, die mit einer Knorpelschicht überzogen sind und durch den Gelenkspalt getrennt werden. Das Gelenk wird von der Gelenkkapsel umgeben, die aus einer äußeren Membran, der *Membrana fibrosa*, und einer inneren Membran, der *Membrana synovialis* (Synovium), besteht. Das Synovium wird aus einer dünnen Zellschicht (1 - 3 Zellen), den Synoviozyten (Typ A Makrophagen-ähnlich, Typ B Fibroblasten-ähnlich) gebildet. B | Bei einem arthritischen Gelenk kommt es aufgrund einer Immunreaktion zu einer Entzündung des Synoviums (Synovitis) und einer massiven Infiltration und/oder Aktivierung von mononukleären Zellen wie T- und B-Zellen sowie Plasmazellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen. Das lymphoide Infiltrat kann diffus sein oder Lymphknoten-ähnliche Strukturen bilden. Die Synovialmembran wird hyperplastisch und weist eine Dicke von mehr als 20 Zellen auf. Zusätzlich kommt es zur Angiogenese und zur Bildung eines Pannus. Osteoklasten sowie matrixabbauende Enzyme, die von Synoviozyten und Chondrozyten exprimiert werden, führen zu Knochen- und Knorpelabbau im rheumatischen Gelenk (Smolen, et al., 2003).

Mononukleäre Zellen, meist CD4+ T-Zellen, infiltrieren das Synovium. B-Zellen und dendritische Zellen bilden Aggregate mit T-Zellen und Gewebemakrophagen und formen in 20% der Patienten Strukturen, die Lymphknoten-Follikeln ähneln (Sweeney, et al., 2004; Firestein, 2003). Das entzündete Synovium beginnt in die benachbarte Knorpelregion im Gelenk einzudringen und fördert die artikuläre Schädigung, die durch Osteoklasten, Chondrozyten und synoviale Fibroblasten vermittelt wird (McInnes, et al., 2007). Es kommt zu einer lokalen Produktion von Autoantikörpern (1.2.1, S.3) und einer Immunkomplexbildung. Die gebildeten Autoantikörper erkennen artikuläre Antigene wie Typ II Kollagen und Proteoglykane und tragen damit wesentlich zur Gelenkschädigung bei (Sweeney, et al., 2004; Firestein, 2003).

Auf zellulärer Ebene sind an der Entzündungsreaktion hauptsächlich Makrophagen, synoviale Fibroblasten, T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen beteiligt, wobei es durch die Aktivierung verschiedener Signalwege in diesen Zellen u.a. zur Ausschüttung pro-

inflammatorischer Zytokine kommt. Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der rheumatoiden Arthritis, wobei TNF- α und IL-1, aber auch IL-17 und IFN- γ Schlüsselfunktionen zugeschrieben werden (Sweeney, et al., 2004).

1.2.3 Zytokine in der rheumatoiden Arthritis

Zytokine sind direkt in viele Immunprozesse, die mit der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis assoziiert sind, involviert. Im rheumatoiden Synovium werden zahlreiche funktionell aktive Zytokine exprimiert, die sowohl redundant als auch pleiotrop sind (Tabelle 1-1) (Jenkins, et al., 2002; McInnes, et al., 2007). Ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen beeinflusst die Induktion der Autoimmunität, die chronische Entzündung und dadurch die Schädigung der Gelenke. Sie stellen deshalb ein Hauptziel bereits existierender Therapien (TNF- α -Blocker) und neuer Therapiestrategien dar (1.4, S.18) (McInnes, et al., 2007).

Tabelle 1-1 | Schlüsselzytokine und ihre Funktionen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis
(Quelle verändert nach McInnes, et al., 2007)

Zytokin	Artikuläre Expression	Mögliche Funktion in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis
IL-1 α und/oder IL-1 β	Monozyten, B-Zellen, synoviale Fibroblasten, Chondrozyten	↑Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen, Matrixmetalloproteinasen, iNOS und Prostaglandinen durch synoviale Fibroblasten; ↑Monozyten Zytokine, PG-Freisetzung; Osteoklastenaktivierung; ↓Synthese von Glykosaminoglykanen ↑iNOS, MMP und Aggrecanase; Adhäsionsmolekülexpression auf Endothelzellen
IL-18	Monozyten, dendritische Zellen, Thrombozyten, Endothelzellen	T-Zell-Differenzierung (Th1-Zellen mit IL-12; Th2-Zellen mit IL-4); Aktivierung, Zytokinfreisetzung und Zytotoxizität durch natürliche Killerzellen; ↓Synthese von Glykosaminoglykanen und iNOS durch Chondrozyten; Zytokinsekretion und Adhäsionsmolekülexpression durch Monozyten; Aktivierung, Zytokinfreisetzung und Migration von polymorphonukleären Leukozyten; pro-angiogen für Endothelzellen
TNF	Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen, Mastzellen, synoviale Fibroblasten, Osteoblasten	↑Monozytenaktivierung, Zytokin- und Prostaglandin-Freisetzung; T-Zell-Apoptose, klonale Regulation und T-Zell-Rezeptor Dysfunktion; ↑Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Zytokinfreisetzung; ↓Synoviale Fibroblastenproliferation und Kollagen-Synthese ↑MMP und Zytokinfreisetzung;
RANKL	Stromazellen, Osteoblasten, T-Zellen	Stimulation der Knochenresorption via Osteoklastenreifung und -aktivierung; moduliert Interaktionen von T-Zellen mit dendritischen Zellen;
IL-17A	Th17-Zellen, synoviale Fibroblasten	↑ Zytokin- und Matrixmetalloproteinase-Freisetzung durch synoviale Fibroblasten; Osteoklastogenese; Hämatopoese; ↓Glykosaminoglykan-Synthese durch Chondrozyten; ↑Zytokinproduktion durch Leukozyten;
IL-12	Makrophagen, DCs	Proliferation und Reifung Th1-Zellen; Zytotoxizität von T-Zellen und natürlichen Killerzellen; B-Zell-Aktivierung
IL-22	Th17-Zellen	Förderung von Hautentzündungen; Inhibitorische Effekte auf IL-4 Produktion von Th2-Zellen (Xie MH, 2000; McInnes, et al., 2007)
IL-23	Makrophagen, DCs	Th17-Zell-Proliferation
IL-7	Synoviale Fibroblasten, Monozyten?	Expansion und Überleben von T-Zellen; Makrophagen-Aktivierung; Hämatopoetische Regulation; Thymische Regulation;
IL-10	Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, DCs, Epithelzellen	↑Produktion von Zytokinen, iNOS und löslichen Rezeptoren durch Makrophagen; ↓T-Zell-Zytokinfreisetzung; ↓MHC-Expression, T _{Reg} -Zell-Reifung und Effektorfunktion; ↓Aktivierung und Zytokinfreisetzung durch dendritische Zellen; ↓MMP- und Kollagen-Produktion durch synoviale Fibroblasten; ↑B-Zell-Isotyp-Wechsel
IL-6	Monozyten, synoviale Fibroblasten, B-Zellen, T-Zellen	Proliferation und Antikörper-Produktion von B-Zellen; Hämatopoese und Thrombopoese; T-Zell-Proliferation, Differenzierung und Zytotoxizität; ↑hepatische Akute-Phase-Antwort; ↑neuroendokrine Effekte
Typ I IFNs	vielfältig	Antivirale Antwort; viele immunmodulatorische Effekte; ↑MHC Expression; Makrophagen Aktivierung; Lymphozyten-Aktivierung, Differenzierung und Überleben (antiproliferativ)

1. Einleitung

Der Verlauf und Erhalt der Arthritis wird durch die parakrine und autokrine Ausschüttung von Zytokinen beeinflusst (Sweeney, et al., 2004). Dabei dominiert die Anwesenheit von Monokinen deutlich die der T-Zell-Zytokine, welche nur in geringen Mengen bis gar nicht im rheumatoiden Synovium nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund wird den T-Lymphozyten in der späten Pathogenese der Krankheit eine geringere Rolle zugeschrieben als den Fibroblasten und Monozyten (Jenkins, et al., 2002). Residente Makrophagen und synoviale Fibroblasten des Synoviums produzieren Faktoren, die entweder sie selber oder die benachbarten Zellen aktivieren und verstärken die synoviale Inflammation. IL-1 und TNF- α werden von synovialen Makrophagen produziert, stimulieren die Fibroblastenproliferation und erhöhen die Produktion von IL-6, dem Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), IL-8 und anderen Chemokinen sowie Enzymen, die an der Gelenkzerstörung beteiligt sind. Diese Faktoren wiederum aktivieren Makrophagen in der Umgebung und fördern eine kontinuierliche Zytokinproduktion. Es entsteht ein positiver Feedback-Mechanismus zwischen Makrophagen und synovialen Fibroblasten, welcher die synoviale Inflammation erhält (Abbildung 1-4) (Sweeney, et al., 2004; Firestein, 2003).

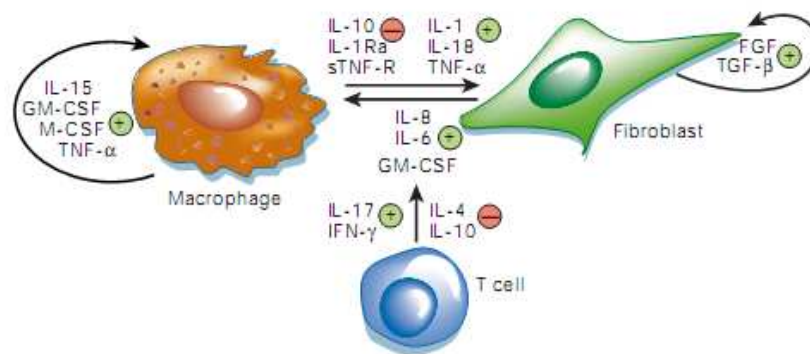


Abbildung 1-4 | Zytokin-Netzwerk in der rheumatoiden Arthritis. Makrophagen und Fibroblasten sind in der Synovialmembran benachbart und produzieren para- und autokrine Zytokine. Pro-inflammatorische Zytokine (+) und anti-inflammatorische Zytokine (-) sind angegeben. Dieses Szenario basiert auf der Interaktion von mesenchymalen Zellen, wobei antigen-präsentierende Zellen an den Inflammationsreaktionen beteiligt sein können (Firestein, 2003).

Suppressive Zytokine wie TGF- β (transforming growth factor- β) und IL-1ra (IL-1 Rezeptor-antagonist) sowie anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-11 werden ebenfalls im Synovium produziert, jedoch in unzureichender Menge, um die Synovitis zu hemmen (Shouda, et al., 2001; Feldmann, et al., 1996). Die Abwesenheit der T-Zell-Zytokine IL-2 und IL-4 könnte die Bildung von regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) hemmen und die Differenzierung von Th1- oder Th17-Zellen fördern (1.2.4, S.8). Die löslichen Zytokinrezeptoren TNFR I und Typ II IL-1R, welche eine regulatorische Funktion ausüben, indem sie TNF und IL-1 von ihren membrangebundenen Rezeptoren fern halten, sind ebenfalls nur in unzureichenden Mengen im synovialen Gewebe vorhanden, um die Homöostase des Gewebes wieder herzustellen.

Im Laufe der Zeit wurde durch die Entdeckung immer neuer beteiligter Faktoren das Zytokin-geflecht komplexer. IL-18 ist z.B. an der Makrophagenaktivierung, IFN γ -Induktion und der lokalen Th1-Differenzierung von T-Zellen beteiligt (Gracie, et al., 1999). IL-15, das von Makrophagen produziert wird, kann die Produktion von TNF- α durch die Aktivierung syno-

vialer T-Zellen induzieren (Ziolkowska, et al., 2000). Synoviale T-Zellen zeigen den Th1/Th17-Phänotyp (1.2.4, S.8) und tragen zum lokalen Zytokinmilieu bei (Loetscher, et al., 1998). IL-17 wird von Th17-Zellen im Synovium produziert und trägt zusammen mit IL-1 und TNF- α zur Fibroblasten-Aktivierung und Knochenzerstörung bei (Chabaud, et al., 1999). Auch Zell-Zell Kontakte zwischen T-Zellen und anderen Zelltypen in der rheumatoiden Arthritis können die Produktion von Zytokinen und Metalloproteinasen fördern und damit zur erhöhten Knochenzerstörung beitragen. Dabei bestimmt der Aktivierungsstatus (über T-Zell-Rezeptoren oder zytokinabhängig) und Phänotyp (Th1, Th2 oder Th17) der T-Zellen, welche Signalwege (z.B. Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K), NF κ B) in den Zielmakrophagen stimuliert werden und welche Zytokine und Chemokine dann sekretiert werden (Brennan, et al., 2002; Dayer, et al., 2004). Die Interaktionen von T-Zellen und Makrophagen kann von IL-4, IL-10 und TGF β durch eine parakrine Regulation inhibiert werden (Dayer, et al., 2004). Die Aktivierung von synovialen Fibroblasten durch T-Zellen erfolgt hauptsächlich über die Präsentation von membrangebundenen Zytokinen, was ein genereller Effektorweg in chronischen Entzündungen sein könnte (McInnes, et al., 2007).

1.2.4 Die Rolle von T-Zellen in der rheumatoiden Arthritis

Aufgrund der genetischen Assoziation mit MHC Klasse II Allelen und dem erhöhten Vorkommen von T-Zellen im entzündeten Synovium sind T-Zellen in die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis involviert. Dies wird auch durch die Notwendigkeit einer Anwesenheit von T-Zellen in verschiedenen Tiermodellen der Arthritis deutlich (Panayi, 2006).

Ein klassisches Paradigma der rheumatoiden Arthritis, das in den 80er Jahren aufgestellt wurde, stellt ebenfalls die T-Zellen, speziell CD4⁺ T-Zellen in den Mittelpunkt (Mosmann, et al., 1986). CD4⁺ T-Zellen können basierend auf ihrem spezifischen Zytokinprofil in Th1- und Th2- Zellen eingeteilt werden. Der Th1-Phänotyp ist für die Beseitigung von intrazellulären Pathogenen zuständig und wird über die Produktion von IFN γ , Lymphotoxin- β und TNF definiert, während der Th2-Phänotyp für die Bekämpfung parasitärer Infektionen wichtig ist und durch die Sekretion von zumeist anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert wird (Schultze-Koops, et al., 2001). Th1-Zytokine verhindern dabei sowohl die Differenzierung von naiven, undifferenzierten T-Zellen in Th2-Zellen als auch die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen durch Th2-Zellen. Ein Ungleichgewicht von Th1- zu Th2-Zellen führt zu einem Überschuss an pro-inflammatorischen gegenüber anti-inflammatorischen Zytokinen und wird als mögliche Ursache für viele Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoide Arthritis und Diabetes angesehen. Eine der Hauptkonsequenzen dieses Ungleichgewichts ist die Produktion von TNF α , die eine Reihe von Ereignissen auslöst, welche zur chronischen Entzündung und der Zerstörung von Knochen und Knorpel führen. Experimentelle Modelle der rheumatoiden Arthritis, die durch Antigene induziert werden, wie z.B. die Kollagen-induzierte Arthritis (1.3, S.17) sind Th1-vermittelt und stellen ein wichtiges Werkzeug zur Aufklärung und Untersuchung verschiedener Prozesse der rheumatoiden Arthritis dar (Boissier MC, 2008). Viele Experimente, meist an Tiermodellen, führten zu der Annahme, dass die rheumatoide Arthritis eine Th1 (T-Helfer 1 Zellen) vermittelte Krankheit ist (Schultze-Koops, et al., 2001; Steinmann, 2007). Obwohl eine Reihe von Erfolgen durch dieses Modell bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis erzielt werden konnten, können einige Ereignisse nicht erklärt werden, wie z.B. die kaum nachweisbare Anwesenheit von

IFN γ im rheumatoiden Synovium, die unzureichende Effizienz von monoklonalen Antikörpern gegen IFN γ und die paradoxen Effekte von IFN γ , welches einerseits in der Lage ist, eine etablierte Arthritis in Mäusen zu mildern, aber andererseits das Auftreten von Arthritis in gesunden Mäusen fördert (Manoury-Schwartz B, 1997; Boissier MC, 1995).

Dieses klassische Th1/Th2-Paradigma wurde durch Studien an Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen in Tiermodellen (experimentelle Autoimmun-Encephalomyelitis und Kollagen-induzierte Arthritis) in den letzten Jahren um einen weiteren T-Helferzelltyp erweitert. Die erst kürzlich beschriebenen IL-17 produzierenden Th17-Zellen werden dabei als wichtiger Effektor postuliert (Lubberts, et al., 2005). Die Induktion von Th17-Zellen aus naiven T-Zellen erfolgt durch die Anwesenheit von IL-6 und TGF- β , während IL-23 für die Proliferation der Th17-Zellen und die Produktion von IL-17 unabdingbar ist (Mangan, et al., 2006; Bettelli E, 2006). Dass Th17-Zellen eine wichtige Rolle in der Arthritis spielen, wird dadurch deutlich, dass IL-6 und IL-23p19 knock-out Mäuse resistent gegen die Entwicklung von Kollagen-induzierter Arthritis sind (Murphy, et al., 2003; Alonzi, et al., 1998; Aggarwal, et al., 2003) und eine Inhibierung oder Überexpression von IL-17 in den Gelenken die Entzündung und Schädigung des Gelenks verhindert bzw. verschlimmert (Lubberts, et al., 2005). Im Gegensatz dazu ist eine IL-12 Deletion und die damit verbundene Abwesenheit von Th1-Zellen in Mäusen mit einer verstärkten Krankheitsausbildung assoziiert (Cua, et al., 2003; Murphy, et al., 2003).

Der Ort der Differenzierung von pathogenen Effektor-T-Zellen in der rheumatoiden Arthritis ist noch nicht bekannt. Das synoviale Milieu enthält zahlreiche, von Makrophagen und Fibroblasten produzierte Zytokine, wie IL-1 β , IL-6, IL12, IL-15, IL-18, IL-23, TNF und TGF β , die die Differenzierung und Expansion von Th1- und/oder Th17-Zellen fördern könnten (Abbildung 1-5, S.10) (McInnes, et al., 2007).

Die Aktivität der beschriebenen Effektor-T-Zellen wird durch regulatorische T-Zellen (T_{Reg}), die eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz spielen, reguliert. T_{Reg} Zellen können ebenfalls im rheumatoiden Synovium gefunden werden, scheinen aber eine eingeschränkte Funktion aufzuweisen. Im Zusammenhang mit der Differenzierung von T_{Reg}-Zellen aus naiven T-Zellen wird die ambivalente Rolle von TGF β deutlich: zusammen mit IL-6 fördert TGF β die Differenzierung in Th17-Zellen, während es in der Abwesenheit von IL-6 in Kombination mit IL-10 die Induktion von T_{Reg}-Zellen fördert (Abbildung 1-5, S.10) (Skapenko, et al., 2005; Ehrenstein, et al., 2004).

1. Einleitung

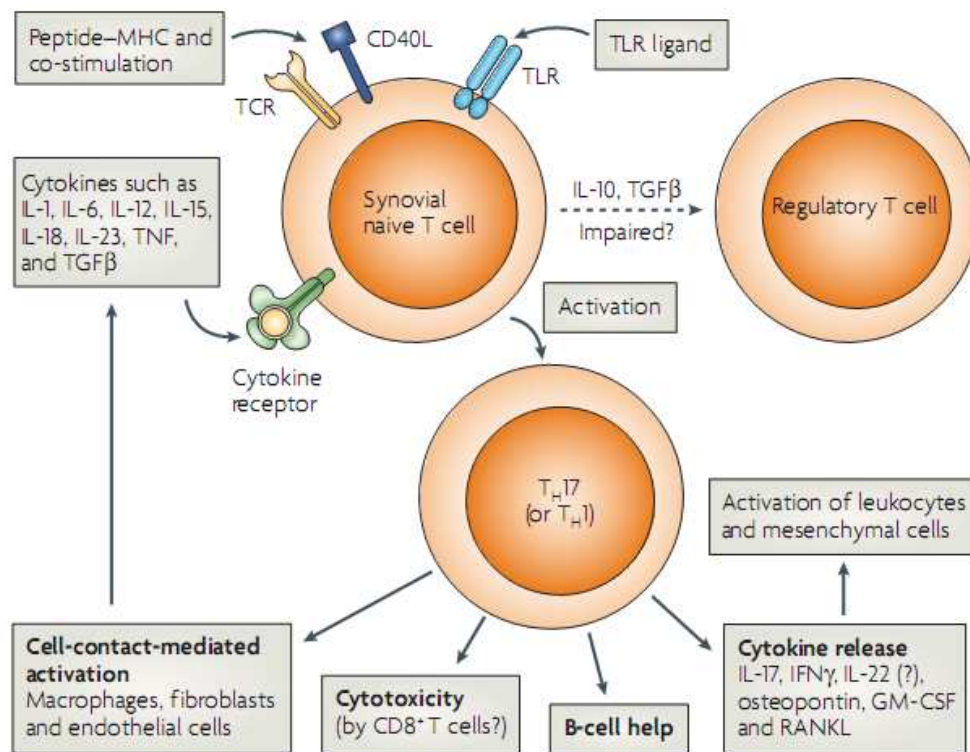


Abbildung 1-5 | Aktivierung von synovialen T-Zellen in der rheumatoiden Arthritis und ihre Schlüsselwirkungen.

Synoviale T-Zellen können über T-Zellrezeptoren und Co-Stimulationswege sowie über Zytokin- oder Toll-like-Rezeptor vermittelte Stimuli aktiviert werden. Die im rheumatoiden Synovium vorhandenen Zytokine IL-12, IL-23, IL-6 und TGF- β fördern die Differenzierung von Th1- bzw. Th17 Zellen. Regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) sind zwar vorhanden, scheinen aber keine optimale regulatorische Aktivität auszuüben. Die aktivierten T-Zellen vermitteln Effektor-Funktionen in der rheumatoiden Arthritis durch die Sekretion von Zytokinen, wodurch Leukozyten und mesenchymale Zellen aktiviert werden, durch die Hilfestellung für B-Zellen und durch Zytotoxizität, die durch CD8+ Zellen vermittelt wird. Sie können ebenfalls Makrophagen, Fibroblasten und endotheliale Zellen durch den direkten Zell-Zell Kontakt aktivieren (McInnes, et al., 2007).

Effektor-Funktionen von Th17-Zellen in der Synovitis können direkt über die Produktion von inflammatorischen Zytokinen erfolgen (Abbildung 1-5, S.10). Die Rolle von IFN γ als Effektorzytokin ist noch nicht vollständig geklärt. In kultivierten synovialen Zellen induziert IFN γ die Zytokinproduktion in Makrophagen und Fibroblasten, wobei die *in vivo*-Signifikanz dieser Induktion aufgrund des geringen IFN γ -Vorkommens im Synovium unklar ist (McInnes, et al., 2007). IL-17 vermittelt viele chronische Entzündungsantworten wie Angiogenese, Rekrutierung von inflammatorischen Zellen und die Induktion von pro-inflammatorischen Mediatoren durch endotheliale und epitheliale Gewebe (Ouyang W, 2008). Weitere T-Zell-abhängige Effektoren sind IL-22, GM-CSF und RANKL, welche sowohl in die Gelenkdegradation (1.2.6, S.12) als auch in den Erhalt und die Förderung der Entzündung involviert sind (Tabelle 1-1, S.6). Weiterhin tragen T-Zellen durch direkte Interaktion mit benachbarten Makrophagen und synovialen Fibroblasten zu deren Aktivierung und damit zur synovialen Entzündung bei (Abbildung 1-4, S.7) (Firestein, 2003).

Obwohl T-Zellen offensichtlich eine große Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis spielen, waren bisherige therapeutische Ansätze basierend auf der Modulation von T-Zellen mit Cyclosporin, CD4- und CD52-spezifischen Antikörpern eher enttäuschend (Keystone, 2003). Künftige therapeutische Strategien, die das neue Paradigma eines

Th1/Th17-Ungleichgewichts im Krankheitsbild mit einbeziehen, werden zeigen, ob dieses sich etablieren kann.

1.2.5 Makrophagen und ihre Effektorzytokine in der rheumatoiden Arthritis

Makrophagen nehmen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis ein. Die synovialen Gewebe-Makrophagen differenzieren aus peripheren Blutmonozyten (Athanasou, 1995) und sind in subsynovialen Bereichen im rheumatoiden Synovium verteilt, während die Deckzellschicht vornehmlich aus synovialen Fibroblasten besteht. Sie sind in die Initiation und Erhaltung der Entzündung, die Adhäsion und Migration von Leukozyten, die Matrixdegradation und Angiogenese involviert. Unter bestimmten Umständen können synoviale Makrophagen in Osteoklasten differenzieren und so auch direkt an der Knochenresorption beteiligt sein (Chang, et al., 1992). Des Weiteren stellen Makrophagen die Hauptproduzenten von inflammatorischen Mediatoren, wie Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen im rheumatoiden Synovium dar (Szekanecz, et al., 2007).

Die Aktivierung und anschließende Sekretion von inflammatorischen Mediatoren von Makrophagen kann über verschiedene Zytokine (TNF α , IL-1, IL-12, IFN γ), Immunkomplexe, direkte Zell-Zell Kontakte mit T-Zellen oder synovialen Fibroblasten, Chemokinen oder Hypoxie erfolgen (Maruotti, et al., 2007). Die wichtigsten Zytokine, die von aktivierten synovialen Makrophagen produziert werden wie TNF α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23 und TGF β sowie ihre Effekte sind in Tabelle 1-1, S. 6 aufgeführt.

TNF α nimmt dabei eine Schlüsselfunktion ein (Feldmann, et al., 1996): Es kann in den meisten synovialen Biopsien nachgewiesen werden, seine Inhibierung supprimiert verschiedene Arthritismodelle, während eine Überexpression eine spontane, erosive inflammatorische Arthritis auslöst (Keffer, et al., 1991). TNF induziert die Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen, das Überleben und die Aktivierung von synovialen Fibroblasten, die Sensibilisierung von Schmerzrezeptoren sowie die Angiogenese – alles Schlüsseleigenschaften der rheumatoiden Arthritis. Dies wird auch durch den enormen Erfolg bei der therapeutischen Inhibierung von TNF deutlich: 70% der Patienten mit etablierter rheumatoider Arthritis zeigen klinische Antworten auf die Behandlung. Innerhalb von 24 Stunden kann eine Senkung von IL-6 und Akute-Phase-Proteinen im Plasma, eine Inhibierung der Migration von Leukozyten, eine Deaktivierung von Endothelzellen und eine Wiederherstellung der regulatorischen T-Zell-Funktion und Phänotyp nachgewiesen werden (Ehrenstein, et al., 2004; Maini, et al., 2000; McInnes, et al., 2007).

IL-6 ist ebenfalls ein wichtiges Effektorzytokin, das sowohl mit lokalen als auch systemischen Symptomen der rheumatoiden Arthritis assoziiert ist. IL-6 ist ein Auslöser der Akute-Phase-Antwort, welche Fieber, sekundärer Amyloidose, Anämie und eine Erhöhung der Akute-Phase-Proteine, wie dem C-reaktiven Protein (CRP), zur Folge hat. Die Förderung der B-Zell-Differenzierung durch IL-6 könnte zur Bildung des Rheumafaktors und anderen Autoantikörpern beitragen. In den Gelenken fördern IL-6 die Osteoklastenaktivierung und induziert die Freisetzung von Metalloproteinasen, die zur Gelenkschädigung beitragen. In Patienten mit rheumatoider Arthritis korrelieren die IL-6-Mengen mit den klinischen Symptomen und dem Schweregrad der Krankheit (Cronstein, 2007). Dies zeigt sich auch in Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis, wo IL-6 für die Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis benötigt

wird (Alonzi, et al., 1998; Sasai, et al., 1999). Klinische Versuche, bei denen Signalwege von IL-6 mit einem monoklonalen Antikörper für lösliche IL-6-Rezeptoren blockiert wurden, reduzierten Aktivität und Symptome der Krankheit (Choy, et al., 2002; Nishimoto, et al., 2004).

IL-1 α und IL-1 β werden im Synovium von Patienten mit rheumatoider Arthritis produziert (Dayer, et al., 2002), wobei Makrophagen die Hauptproduzenten von IL-1 β sind. IL-1 β stimuliert die Produktion von Mediatoren wie Prostaglandin E₂, Stickstoffmonoxid (NO), Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Außerdem stimuliert IL-1 die Synthese und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen und anderen Enzymen, die in die Knorpeldegradation in der rheumatoiden Arthritis involviert sind. *In vitro* und *in vivo* werden die Effekte von IL-1 durch einen natürlichen Inhibitor, dem IL-1-Rezeptorantagonisten, inhibiert. Dieser verhindert die Interaktion von IL-1 mit seinem Zelloberflächenrezeptor (Jaques, et al., 2006).

1.2.6 Gewebedegradation in der rheumatoiden Arthritis

Die Zerstörung der extrazellulären Matrix im Verlauf der rheumatoiden Arthritis führt zu erheblichen Einschränkungen und Invalidität bei den betroffenen Patienten. Verschiedene Mechanismen der Knochen- und Knorpeldegradation sind an der Gelenkzerstörung in der rheumatoiden Arthritis beteiligt.

1.2.6.1 Knorpeldegradation

Artikulärer Knorpel besteht aus zwei Schichten: einer nicht-mineralisierten Oberflächenschicht und einer mineralisierten Schicht in unmittelbarer Nähe zum Knochen. Dabei wird nur letztere durch Osteoklasten resorbiert, wohingegen die Degradation des nicht-mineralisierten Knorpels überwiegend durch die Produktion von Proteasen durch synoviale Fibroblasten und Chondrozyten sowie zelluläre Infiltration von synovialen Fibroblasten in die Matrix vermittelt wird (Abbildung 1-6, S.13) (McInnes, et al., 2007). Chondrozyten verändern durch das inflammatorische Zytokinemilieu im arthritischen Gelenk, besonders durch IL-1 β , IL-17, IL-18 und TNF, ihre Syntheseigenschaften. Sie gehen von einem Matrix-aufbauenden Zustand (Produktion von Kollagen und Proteoglykan) in einen katabolen Status über, der durch die Produktion von Matrix-abbauenden Enzymen wie Metalloproteinasen und Aggrecanasen (ADAMTS) charakterisiert ist. Zusätzlich werden diese degradierenden Enzyme von synovialen Fibroblasten, Neutrophilen und Mastzellen, die in unmittelbarer Nähe zum Gelenkknorpel sind, produziert (McInnes, et al., 2007).

Von den beteiligten Zytokinen nimmt IL-1 β eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der Knorpeldegradation ein. Es inhibiert die Synthese von Matrix und induziert die Freisetzung von Matrix-degradierenden Enzymen wie MMP1, MMP3, MMP8, MMP13 und MMP14 (Eberhardt, et al., 2000; Catterall, et al., 2001). Dies wird auch dadurch deutlich, dass IL-1-vermittelte Tiermodelle wie Kollagen-induzierte Arthritis und Mäuse mit einer IL-1ra-Defizienz eine schnelle und extensive Knorpeldegradation aufweisen (Van den Berg, 2002). TNF hingegen spielt bei der Induktion der Expression von Matrix-abbauenden Enzymen eine weniger wichtige Rolle und ist nur insofern beteiligt, als dass es die Produktion von IL-1 induziert. Von Th17-Zellen produziertes IL-17 hingegen wirkt direkt und synergistisch mit IL-1 β und TNF, um den Knorpelabbau zu fördern. Die Injektion von IL-17 ins Gelenk erhöht den Proteoglykanabbau (Dudler, et al., 2000) und verstärkt nach Induktion der Kollagen-

induzierten Arthritis die Knorpelschädigung, führt zu Erosionen und dem Absterben von Chondrozyten (Lubberts, et al., 2002). IL-17 wirkt IL-1 β -unabhängig, da es auch in IL-1 β defizienten Mäusen zur Knorpelzerstörung führen kann.

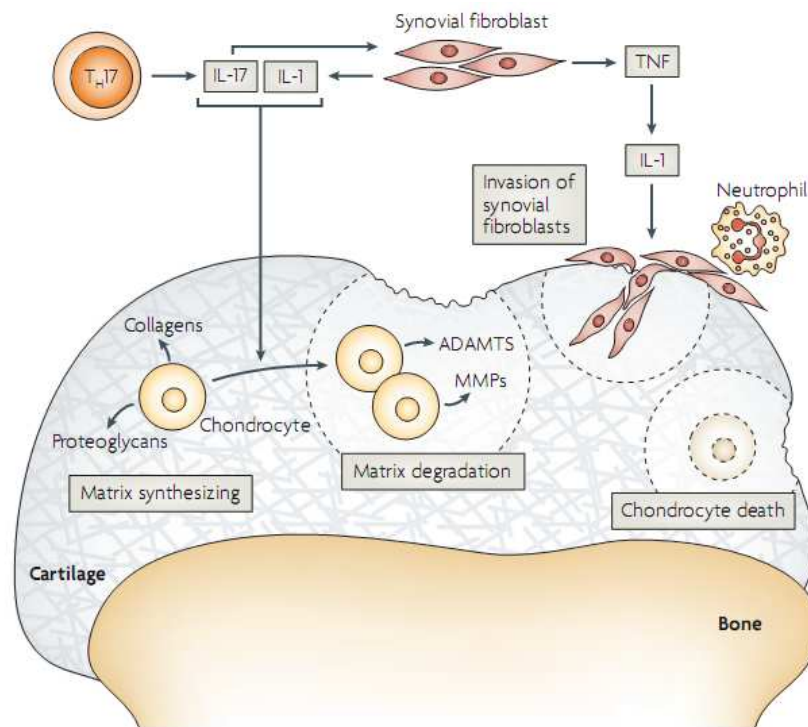


Abbildung 1-6 | Regulation der Aktivierung von Chondrozyten und der Knorpeldegradation in rheumatoider Arthritis. Die Knorpeldegradation ist ein schrittweiser Prozess, der auf der Freisetzung von Matrix-abbauenden Enzymen wie Aggrecanasen (ADAMTS) und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) beruht. Zytokine wie IL-1 und IL-17 verändern die Syntheseigenschaften von Chondrozyten, die dann Matrix-abbauende Enzyme statt Matrixmoleküle produzieren. Zusätzlich produzieren synoviale Fibroblasten Matrix-abbauende Enzyme und beginnen nach der Aktivierung durch Zytokine wie TNF α und IL-1 in den Knorpel einzufallen. Das Absterben von Chondrozyten ist ein weiterer Prozess bei der Knorpelschädigung, der zur Bildung von Hohlräumen führt und verhindert, dass der Knorpel die Matrix wieder auffüllt (McInnes, et al., 2007).

Zusätzlich führt die entzündliche Umgebung dazu, dass sich die synovialen Fibroblasten ständig verändern. Oxidativer Stress und eine gestörte DNA-Reparatur sind potentielle Ursachen für Mutationen in bestimmten Schlüsselgenen, wie dem p53-Tumorsuppressorgen, und können dadurch die Proliferation der Synoviozyten und damit die Knorpelinvasion erhöhen (Tak, et al., 2000).

1.2.6.2 Knochendegradation

Bei der rheumatoiden Arthritis ist die normale, physiologische Homöostase zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau zugunsten der Knochenresorption verschoben. Diese wird von Osteoklasten vermittelt (Teitelbaum, 2000) und erfolgt an der Grenze zwischen synovialen Gewebe und Gelenkknochen. Dadurch wird das Eindringen von synovialen Fibroblasten ermöglicht, was in der Bildung eines Pannus resultiert (Gravallese, et al., 2000). Osteoklasten-Vorläuferzellen strömen in das rheumatoide Synovium ein und differenzieren in reife Osteoklasten. Dieser Prozess der Differenzierung sowie die Aktivierung der metabolischen Aktivität der Osteoklasten basiert auf der Interaktion mit mesenchymalen Zellen und Lymphozyten und wird durch Zytokine reguliert (McInnes, et al., 2007). Hierbei sind M-CSF (,macrophage colony-stimulating factor‘) und RANKL (,receptor activator of nuclear factor κ B (RANK)

ligand') von essentieller Bedeutung, da das Fehlen einer der beiden Faktoren ausreichend ist, um die Ostoklastogenese zu blockieren (Yoshida, et al., 1990). M-CSF wird von synovialen Fibroblasten durch TNF und zu einem geringeren Maße von T-Zellen durch IL-7 produziert (Seitz, et al., 1994) und spielt eine maßgebliche Rolle bei der frühen Differenzierung von Osteoklasten. Der RANKL-Rezeptor, RANK, wird auf Osteoklasten, Osteoklasten-Vorläufern und Chondrozyten exprimiert. Synoviale Fibroblasten und aktivierte T-Zellen im Synovium produzieren RANKL, der die Reifung und Aktivierung von Osteoklasten induziert. Die Expression von RANKL wiederum wird durch inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1 β , IL-6 und IL-17 reguliert, wird aber auch durch andere inflammatorische Mediatoren wie Prostaglandin E₂ (Horwood, et al., 1998; Kotake, et al., 1999) angeregt. RANKL ist in die späte Differenzierung der Osteoklasten involviert und vermittelt ihre Aktivität zur Knochenresorption.

Andere Zytokine tragen ebenfalls zur Knochenresorption bei. TNF verstärkt die RANKL induzierte Osteoklastogenese (Lam, et al., 2000) und mobilisiert CD11b⁺-Osteoklasten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (Li, et al., 2004). IL-1 β induziert die Expression von RANKL, verstärkt die RANKL-induzierte Osteoklastogenese und ist an der Regulation der RANK-Expression beteiligt (McInnes, et al., 2007). Die Expression von RANKL, TNF und IL-1 β durch synoviale Fibroblasten wird von IL-17 gefördert (Sato, et al., 2006). Obwohl Th1 Zellen RANKL exprimieren und damit zur Osteoklastogenese beitragen, führt eine Stimulation mit IL-12 oder IL-18 zur Produktion von IFN γ und GM-CSF, die beide einen inhibitorischen Effekt auf die Bildung von Osteoklasten haben (Takayanagi, et al., 2000; Udagawa, et al., 1997).

Die Knochenbildung als physiologische Gegenreaktion bei verstärkter Knochenresorption wird von Osteoblasten vermittelt und ist in der rheumatoiden Arthritis so gut wie nicht vorhanden. Die Regulation der Knochenbildung unter arthritischen Bedingungen ist nicht sehr gut untersucht, wobei Zytokine wie TNF wieder eine Rolle zu spielen scheinen. TNF inhibiert die Funktion und Differenzierung von Osteoblasten (Bertolini, et al., 1986) und ist für eine erhöhte Produktion von sekretorischen Molekülen wie Dickkopf Homolog 1 (DKK1) verantwortlich, das WNT-Proteine inhibiert und dadurch Knochen- und Knorpelbildung inhibiert (Diarra, et al., 2007).

1.2.7 Signalweiterleitung in der rheumatoiden Arthritis

Signaltransduktionswege sind intrazelluläre Mechanismen, durch die die Zellen auf Umgebungsstress reagieren und sich anpassen können. Generell wird durch die Ligation von spezifischen Zelloberflächenrezeptoren, die das extrazelluläre Milieu wahrnehmen, die Aktivierung einer Signalkaskade in Gang gesetzt, welche schließlich die Gen- und Proteinexpression verändert und an die extrazelluläre Situation anpasst. Im rheumatoiden Synovium werden Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren aktiviert (Abbildung 1-7, S.15) (Firestein, 2003). Hierbei sind NF κ B, Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinasen und der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1) besonders an der Regulation der synovialen Inflammation und Gelenkdegradation beteiligt und stellen potentielle Ziele für künftige Therapieansätze dar (Sweeney, et al., 2004).

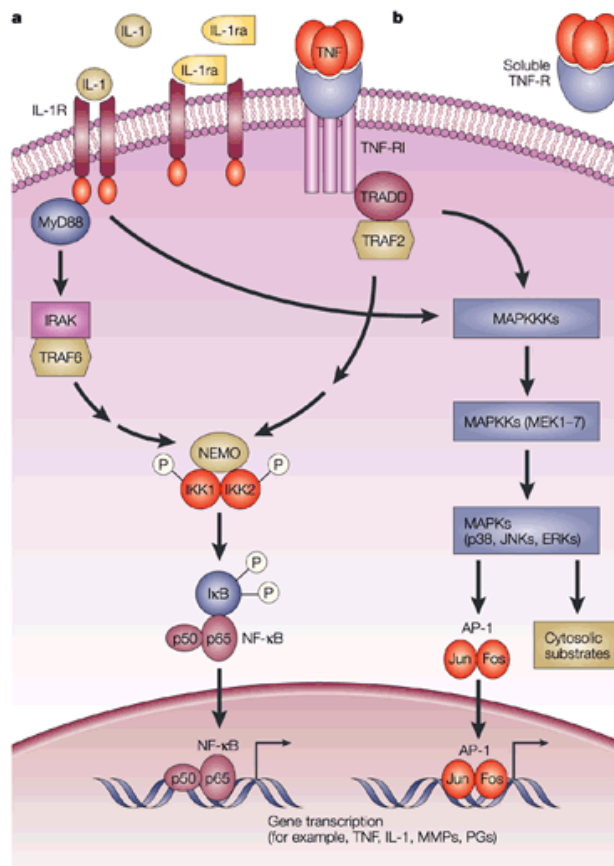


Abbildung 1-7 | Überblick über IL-1 und TNF induzierte MAPK und NFκB Signalwege. a. | zeigt den NFκB Signalweg und b. | den MAPK-Signalweg. Beide können über die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNFα induziert werden und führen zur Transkription von Genen, die für verschiedene Moleküle wie Zytokine, Chemokine, Matrixmetalloproteinasen und Prostaglandine codieren. Die Beschreibung der Signalwege und ihrer Rolle in der rheumatoiden Arthritis erfolgt im Haupttext (Smolen, et al., 2003).

1.2.7.1 Nuklear Faktor-kappa B (NFκB) – Signalweg

NFκB wird im arthritischen Synovium aktiviert und kontrolliert die Transkription von inflammatorischen Genen, die an der rheumatoiden Arthritis beteiligt sind wie beispielsweise TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, Cyclooxygenase-2, induzierbare Nitritoxid-Synthetase und Matrixmetalloproteinasen (Han, et al., 1998). Im ‚kanonischen‘ NFκB-Signalweg, der Heterodimere aus p50/p65 involviert, führen inflammatorische Zytokine wie TNFα und IL-1β oder andere Aktivierungssignale zur Phosphorylierung des natürlichen NFκB-Inhibitors IκB und somit zur Aktivierung des IκB-Kinase-Signalkomplexes, bestehend aus IKK1(α), IKK2(β) und der regulatorischen Untereinheit NEMO (‚NFκB essential modulator‘, IKKγ) in den Synoviozyten. Die Phosphorylierung von IκB führt zu dessen Abbau, sodass NFκB freigegeben wird und in den Kern translozieren kann, um dort spezifische Gene zu aktivieren (Abbildung 1-7, S.15) (Sweeney, et al., 2004; Smolen, et al., 2003; Simmonds, et al., 2008). Aktive NFκB-Transkriptionsfaktoren konnten in kultivierten synovialen Fibroblasten (Handel, et al., 1995), in humanen arthritischen Gelenken (Marok, et al., 1996) und in den Gelenken von Tieren mit experimentell induzierter Arthritis (Han, et al., 1998) nachgewiesen werden. Die beiden NFκB-Untereinheiten p50 und p65 wurden in den Zellkernen von synovialen Fibroblasten der Synovialmembran und in Makrophagen nachgewiesen (Handel, et al., 1995; Benito, et al., 2004). Studien an experimentell induzierter Arthritis in knock-out Mäusen für p50 und c-Rel, beides Mitglieder der NFκB-Familie, zeigten dass die Abwesenheit von p50 einen kompletten

Verlust der humoralen Antwort verursacht, die T-Zell-Proliferation hemmt und eine Resistenz gegen Arthritis verleiht, während ein Fehlen von c-Rel keinen oder nur geringen Einfluss auf die Induktion und den Verlauf der Arthritis hatte (Campbell, et al., 2000). Dies bestätigt – neben zahlreichen weiteren Studien – eine prädominante Rolle von p50 (beziehungsweise des p50/p65-Heterodimers) bei der Entzündungsreaktion der rheumatoiden Arthritis und somit des kanonischen NFκB-Signalweges. Deshalb sind NFκB-Inhibitoren potentielle Kandidaten für die Therapie von rheumatoider Arthritis, wobei die kanonischen IKKs (IKK1 und IKK2), die wohl vielversprechendsten Ziele im NFκB Signalweg darstellen (Simmonds, et al., 2008).

1.2.7.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) – Signalwege

Als „MAPK-Signalwege“ werden eine Reihe von parallelen Kinase-Kaskaden bezeichnet, die das Überleben und die Proliferation von Zellen sowie die Produktion von Zytokinen und Metalloproteinasen regulieren und durch die Bindung von Zytokinen an ihre Zelloberflächenrezeptoren und anschließende Rekrutierung von Adapterproteinen angeregt werden. Diese Kinasen phosphorylieren Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste von intrazellulären Proteinen und werden in drei Gruppen eingeteilt: c-Jun N-terminale Kinase (JNK), extrazelluläre, signalregulierte Kinase (ERK) und p38 MAPK (Abbildung 1-7, S.15) (Johnson, et al., 2002). ERK wird hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren aktiviert, während pro-inflammatorische Zytokine meist JNK- und p38-MAPK-Kaskaden aktivieren (Smolen, et al., 2003). Die Aktivität der MAPK wird von im Signalweg oberhalb (‘upstream’) gelegenen MAPKK reguliert, die wiederum von MAPKKK aktiviert werden können. Alle drei MAPK werden im synovialen Gewebe exprimiert und phosphoryliert und können die Expression von Zytokinen und Metalloproteinasen induzieren (Schett, et al., 2000).

1.2.7.2.1 p38 MAPK

Der p38-Signalweg hat ein großes Potential als therapeutisches Ziel in der rheumatoiden Arthritis, da er die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen *in vitro* und *in vivo* regulieren kann (Fijen, et al., 2001). Von den vier identifizierten Isoformen α , β , γ und δ ist p38 α am wichtigsten für die Regulation der Zytokinproduktion in Makrophagen. P38 MAPK werden im Synovium von Patienten mit rheumatoider Arthritis exprimiert und können durch zahlreiche Zytokine in kultivierten synovialen Fibroblasten aktiviert werden (Schett, et al., 2000; Han, et al., 1999). Die Funktion von p38 wird von zwei, im Signalweg oberhalb gelegenen Kinasen, MKK3 und MKK6, reguliert, die beide ebenfalls in aktiver Form im arthritischen Synovium vorliegen und stabile Komplexe mit p38 in stimulierten synovialen Fibroblasten bilden (Chabaud-Riou, et al., 2004). Im Tiermodell konnte durch die Verwendung eines p38-Inhibitors (FR167653) die Induktion von Kollagen-induzierter Arthritis in Ratten verhindert werden und eine Behandlung nach Einsatz der Arthritis verhinderte die Gelenkzerstörung (Nishikawa, et al., 2003). Durch die Inhibition von p38 wurden ebenfalls die Level von TNF α und IL-1 im Serum gesenkt und die von synovialen Fibroblasten induzierte Osteoklastendifferenzierung gehemmt. p38 reguliert die Aktivierung von Osteoklasten, welche die Knochenerosion in der rheumatoiden Arthritis vermitteln (Pargellis, et al., 2003).

1.2.7.2.2 C-Jun terminale Kinase (JNK)

JNK ist eine der wichtigsten MAPK, die für die Produktion von MMPs und die Gelenkzerstörung in inflammatorischen Modellen der Arthritis benötigt wird (Han, et al., 2001). Ein

Schlüsseltranskriptionsfaktor, der durch die MAPK JNK aktiviert wird, ist das Aktivatorprotein-1 (AP-1). Die Bindungsstelle für AP-1 kann in Promotorregionen von vielen Genen gefunden werden, die an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt sind, wie z.B. TNF- α und verschiedenen Metalloproteinasen. Nach der Stimulation von Synoviozyten mit pro-inflammatorischen Zytokinen wird die c-Jun Komponente von AP-1 durch JNK phosphoryliert, und der so aktivierte Transkriptionsfaktor induziert eine massive Expression verschiedener Proteasen und Zytokine. Die Expression von c-Jun und c-Fos im rheumatoiden Synovium ist deutlich erhöht und in den Zellkernen der synovialen Zellen lokalisiert (Sweeney, et al., 2004). Für die Regulation der JNK-Aktivität in der rheumatoiden Arthritis scheinen hauptsächlich die im Signalweg oberhalb gelegenen Kinasen MKK4 und MKK7 verantwortlich zu sein, da sie einen stabilen Komplex mit JNK bilden (Sundarrajan, et al., 2003). Von den drei bekannten JNK-Isoformen (JNK1, JNK2 und JNK3) wird JNK2 konstitutiv und prädominant (90%) in Synoviozyten in der rheumatoiden Arthritis exprimiert, wobei die Differenz von JNK1 gebildet wird. Studien an einem passiven Kollagen-induzierten Arthritis-Modell in JNK2 knock-out Mäusen zeigten jedoch, dass eine Inhibition von beiden notwendig ist, um die Expression der JNK-regulierten Gene effektiv zu verhindern und damit die Gelenkdegradation und die Inflammation in der rheumatoiden Arthritis zu vermindern (Han, et al., 2002).

1.3 Kollagen-induzierte Arthritis

Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) ist eine experimentelle Autoimmunerkrankung, die in für diese Krankheit anfälligen Nager- und nicht humanen Primatenstämmen durch die Immunisierung mit Kollagen Typ II ausgelöst werden kann (Rosloniec, et al., 1996). Neben dem CIA-Modell (Courtenay, et al., 1980) gibt es noch weitere, etablierte Mausmodelle der rheumatoiden Arthritis, die auf einer Immunisierung beruhen, wie die Antigen-Proteoglykan-induzierte Arthritis (PGIA) (Finnegan, et al., 1999), Streptokokken-Zellwand-Arthritis (Koga, et al., 1985) und Antigen-induzierte-Arthritis (Brackertz, et al., 1977). Weiterhin können chemisch induzierte Arthritismodelle, wie die Öl-induzierte Arthritis (Hopkins, et al., 1984) und spontane Modelle, wie die TNF- α -transgene Maus (Butler, et al., 1997) oder die K/BxN T-Zell-Rezeptor-transgene Maus (Kouskoff, et al., 1996) unterschieden werden. Alle diese Modelle haben spezifische Vor- und Nachteile, wobei jedoch das CIA-Modell am besten in Mäusen charakterisiert ist und häufig zum Test neuer Therapien und zum Studium der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird (Brand, et al., 2007). Nach der Immunisierung mit Kollagen II, welches einen Hauptbestandteil des artikulären Knorpels darstellt, entwickeln die Mäuse eine autoimmun-vermittelte Polyarthrit. Die Pathologie der experimentell induzierten Arthritis ähnelt in klinischen, histologischen und immunologischen Eigenschaften sehr der humanen Erkrankung. So zeigen beide eine synoviale Hyperplasie, mononukleäre Zellinfiltration, Knorpel- und Knochendegradation sowie eine Verknüpfung zwischen Prädisposition und Expression spezifischer MHC-Klasse-II-Gene. Im Gegensatz zur humanen Erkrankung kann jedoch der rheumatoide Faktor im CIA-Modell nicht nachgewiesen werden und die experimentelle Erkrankung verläuft monophasisch (Holmdahl, et al., 1985; Boissier, et al., 1987). Die klinische Manifestation erfolgt 30 Tage nach der Injektion von Kollagen II und dauert ungefähr 2 Monate. Die Mechanismen, die der Gelenkkrankheit zugrunde liegen, beinhalten Zell-vermittelte wie humorale Antworten gegen Kollagen II. Das

Modell basiert auf der Anwesenheit von T-Zellen, da eine Elimination derselben den Ausbruch der Krankheit verhindert. Nach Injektion des Kollagen II wird dieses sofort durch APCs den T-Zellen präsentiert. Dies resultiert in der Aktivierung und Expansion von Antigen-spezifischen $CD4^+$ -T-Zellen, die den Th1-Phänotyp aufweisen und eine Immunantwort initiieren (Abbildung 1-8, S.18) (Fournier, 2005; Doncarli, et al., 1997). Diese prä-klinische Phase in der CIA spiegelt das Th1/Th2-Ungleichgewicht, das in der rheumatoiden Arthritis auftritt, wider (Fournier, 2005).

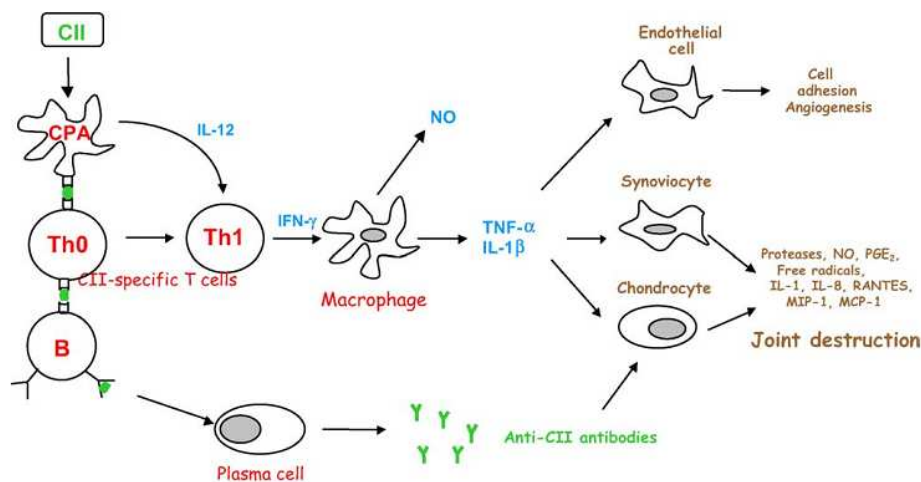


Abbildung 1-8 | Pathophysiologie der Kollagen-induzierten Arthritis. Erläuterungen siehe Haupttext (Fournier, 2005).

1.4 Therapien für die rheumatoide Arthritis

Traditionelle, krankheits-modifizierende, antirheumatische Medikamente (DMARDs) wie Methotrexat gehören immer noch zur ersten Wahl bei der Behandlung von neu-diagnostizierten Arthritispatienten (Luqmani, et al., 2006). Die Einführung von sogenannten Biologika, die spezifisch Zytokinmediatoren der Entzündungsantwort hemmen, in den späten 1990er Jahren hat die Behandlung der rheumatoiden Arthritis revolutioniert. Die erste Generation der Biologika sind die TNF α -Antagonisten Infliximab, Etanercept, Adalimumab sowie der IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra (Moreland, et al., 1997; Gabay, et al., 1998). Diese Medikamente haben eine schnellere Wirkung als die traditionellen DMARDs, zeigen eine schnelle und gleichbleibende therapeutische Wirkung und benötigen keine regelmäßige, laboratorische Überwachung (Siddiqui, 2007). Die Blockierung von TNF als therapeutisches Ziel hat sich als sehr erfolgreich in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis erwiesen, wobei die TNF-Inhibitoren hauptsächlich über die Neutralisierung von TNF in Blut und Gewebe wirken. Trotzdem viele Patienten gut auf die Behandlung ansprechen, zeigen aber leider auch eine Reihe von Patienten nur teilweise oder gar keine Reaktionen (Sweeney, et al., 2004; Voll, et al., 2005). Außerdem haben derzeitige Anti-TNF-Therapien einige Nachteile: Die Krankheit wird nicht geheilt und das Einstellen der Behandlung resultiert in einem Wiederauftreten der Krankheit in Patienten mit rheumatoider Arthritis. Weiterhin ist eine wiederholte, systemische Zufuhr von relativ hohen Dosen nötig, um konstante, therapeutisch wirksame Level des Medikaments im Gelenk zu halten. Die Arthritis kann für Jahrzehnte, wenn nicht ein ganzes Leben dauern und eine langzeitliche Behandlung ist deshalb unvermeidlich, wobei eine längere Behandlung mit TNF α -Blockern *per se* ein gewisses Gesundheitsrisiko mit sich

bringt, da TNF essentiell für die normale Immunantwort und die Unterdrückung von Tumoren ist. Patienten haben ein erhöhtes Infektionsrisiko (Tuberkulose) und sind anfällig für Multiple Sklerose (Van de Loo, et al., 2004). Auch der Kostenfaktor (10.000-20.000 US\$ pro Jahr) ist ein wesentlicher Punkt. Infolge dessen besteht eine Notwendigkeit in der Suche nach neuen Strategien, Therapieformen und Zielen.

1.4.1 Zytokin-basierte Therapien

Unter den Zytokinen gibt es zahlreiche, potentielle therapeutische Ziele. Derzeitige Untersuchungen lassen vermuten, dass eine Inhibierung von IL-6 und IL-15 (Baslund, et al., 2005; Nishimoto, et al., 2006) sowie möglicherweise von IL-12, IL-23, IL18 und IL-17 (McInnes, et al., 2005) therapeutisches Potential aufweisen könnten (Tabelle 1-2, S.19). Die Auswahl eines Zytokins als therapeutisches Ziel ist nicht einfach, da die Hierarchien im Zytokineflecht der rheumatoiden Arthritis immer noch nicht vollständig geklärt sind. Das ursprünglich favorisierte Modell, in welchem TNF eine Schlüsselrolle in der Aktivierung anderer Zytokine spielt (Feldmann, et al., 1996), wird nur teilweise bestätigt, da eine Anzahl von Patienten zum einen nicht auf eine Inhibierung von TNF ansprechen und zum anderen eine variable TNF-Expression in individuellen Gelenken gefunden werden kann. Dies deutet auf die Anwesenheit von parallelen Zytokinwegen hin, die auf mehreren Ebenen miteinander in Verbindung stehen. Deshalb müssen weitere Studien zeigen, welche Zytokine – neben TNF – eine Schlüsselfunktion in der synovialen Entzündung einnehmen (McInnes, et al., 2007).

Tabelle 1-2 | *Ausgewählte Zytokine als therapeutische Ziele in der rheumatoiden Arthritis*
(Quelle verändert nach McInnes, et al., 2007)

Zytokin	Vorteile als Ziel	Nachteile als Ziel	Entwicklungsstatus	Agencien
TNF	Gute Bioaktivität <i>in vitro</i> und in Modellen; validiertes, klinisches Ziel; Effizienz in ~70% der Patienten	Infektionsgefahr (z.B. Tuberkulose); möglicherweise erhöhte Malignität	Weite klinische Anwendung	Infliximab; Adalimumab (TNF-spezifische Antikörper); Etanercept (TNF-Rezeptor-Fc Fusionsprotein)
IL-1	Gute Bioaktivität <i>in vitro</i> und in Modellen; besondere Rolle in Matrixdegradation	Limitierte Effizienz in klinischen Versuchen; Infektionsgefahr	Lizensierte klinische Verwendung	Anakinra (rekombinanter IL-1Ra)
IL-6	Gute Bioaktivität <i>in vitro</i> und in Modellen; bisher gute Effizienz in klinischen Tests	Essentielle Rolle in der Wirtsverteidigung ? Lipid und vaskuläre Modifikation?	Klinische Testphase III	Tocilizumab (IL-6-Rezeptor-spezifischer Antikörper)
IL-12 od. IL-23	Gute Bioreaktivität in Modellen; Rolle bei Th1- und/oder Th17-Zellexpansion; Rolle beim Brechen der Toleranz?	Begrenzte Untersuchung in synovialer Biologie; essentielle Rolle in der Wirtsverteidigung ?	Prä-klinische Phase und Konzeptprüfung	P40 und p19 spezifische Antikörper;
GM-CSF	Gute Bioreaktivität <i>in vitro</i> und in Modellen	Unklare hierarchische Priorität in der rheumatoiden Arthritis	Prä-klinische Phase oder Konzeptprüfung	Zytokin- oder Rezeptor-spezifischer Antikörper
IL-17	Gute Bioreaktivität <i>in vitro</i> (Synergie mit TNF); Schlüsselrolle in Nagermodellen der Autoimmunität	Humane Biologie muss geklärt werden; essentielle Rolle in der Wirtsverteidigung?	Klinische Testphase I	Zytokin-spezifischer Antikörper
IL-18	Gute Bioreaktivität <i>in vitro</i>	Mehrdeutige <i>in vivo</i> -Ziele; essentielle Rolle in der Wirtsverteidigung?	Klinische Testphase I	Zytokin spezifischer Antikörper; IL-18-Bindungsprotein

Klinische Studien lassen vermuten, dass IL-6 und IL-15 diese Rolle in einigen Patienten der rheumatoiden Arthritis spielen könnten. Studien mit einem Anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper (Tocilizumab) lassen auf eine nahezu gleiche Effektivität wie TNF α -gerichtete Ansätze schließen (Wendling, et al., 1993; Smolen, et al., 2008). IL-18 kann mit einem IL-18-Bindungsprotein inhibiert werden, welches die Aktivierung von Makrophagen und die Th1-Dominanz im Synovium inhibieren kann (McInnes, et al., 2005). Eine Blockierung von IL-15 zielt auf eine verminderte T-Zell-Aktivierung und Makrophagen vermittelte TNF α -Produktion ab (McInnes, et al., 2005). Die Modulation von IFN γ als therapeutisches Ziel in Tiermodellen der Arthritis zeigte widersprüchliche Ergebnisse, mit sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Effekten, je nach Modell und untersuchten Parametern. Therapeutische Administration von IFN γ in Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte keine schädliche Wirkung (Veys, et al., 1997), während die Blockierung von IFN γ mit einem polyklonalen Antikörper zur Unterdrückung der Krankheitsaktivität führte (Sigidin, et al., 2001).

Eine Alternative zur Inhibierung pro-inflammatorischer Moleküle ist die Applikation von anti-inflammatorischen Zytokinen. Vorstudien mit rekombinantem IL-10, IL-4 und IL-11 in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis wurden bereits durchgeführt. IL-4 induziert Th2-Zellen, die eine schützende Funktion in der immun-vermittelten Entzündungsreaktion haben könnten. IL-10 und IL-4 inhibieren beide die Produktion von Matrixmetalloproteinasen, verringern die Sekretion und Funktion von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α und erhöhen die Produktion von IL-1ra und löslichen TNF-Rezeptoren (Vannier, et al., 1992; Joyce, et al., 1994). Die *in vivo*-Administration von IL-10 milderte die Kollagen-induzierte Arthritis in Mäusen (Walmsley, et al., 1996). In einem klinischen Phase I Versuch mit rekombinantem, humanen IL-10 konnte ebenfalls eine Besserung der Krankheitsaktivität beobachtet werden (Maini, et al., 1997).

1.4.2 Signaltransduktionswege als therapeutische Ziele

Die Identifikation von intrazellulären Mediatoren, die maßgeblich in die Synovitis involviert sind, machte die NF κ B- und MAPK-Signaltransduktionswege (1.2.7, S.14) zu einem vielversprechenden therapeutischem Ziel (Firestein, 2003).

Die Verwendung von kleinen Molekülinhibitoren („small molecule inhibitors“) für p38, die bei oraler Anwendung eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen, zeigten vielversprechende Ergebnisse in verschiedenen Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis, wobei sie sowohl anti-inflammatorische Effekte als auch eine verminderte Gelenkschädigung zur Folge hatten. Die Inhibition von JNK führte zu einer verminderten Entzündung und Schutz vor Knochen- und Knorpelschädigungen (Sweeney, et al., 2004).

Die Blockierung des NF κ B-Signalweges durch eine intra-artikuläre Injektion mit dominant-negativen, adenoviral exprimiertem IKK2, war in Tiermodellen ebenfalls erfolgversprechend. Kleine Molekülinhibitoren gegen IKK2 zeigten Effektivität in Adjuvanz-induzierter Arthritis in Ratten und Kollagen-induzierter Arthritis in Mäusen. Ein großer Nachteil einer NF κ B-gerichteten Therapie ist jedoch, dass die Wirtsverteidigung in einer nicht tolerierbaren Art und Weise beeinträchtigt werden könnte (Sweeney, et al., 2004).

1.4.3 Weitere therapeutische Ziele in der rheumatoiden Arthritis

Neben Zytokinen und Signaltransduktionswegen gibt es eine Reihe weiterer therapeutischer Ziele für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis, wie T- und B-Zell gerichtete Therapien, die Inhibierung von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Matrixmetalloproteinasen und anderen Faktoren, die an der Knochen- und Knorpeldegradation beteiligt sind, sowie der Angiogenese (Sweeney, et al., 2004).

T-Zell gerichtete Therapien, die auf der Deletion von T-Zellen basieren, wie anti-CD4, anti-CD5 und Anti-CD52-Therapien haben nur einen transienten therapeutischen Effekt, was auf die Repopulation von autoreaktiven T-Zellen zurückzuführen sein könnte. Andere T-Zell-Therapieansätze beinhalten die Inhibition von T-Zell Rezeptoren durch Impfung mit immunregulatorischen Peptiden, werden aber durch die reduzierte klinische Effizienz und Dauer sowie erhöhte Nebeneffekte limitiert. Im Gegensatz dazu sind Therapien, die auf der Aktivierung und speziell der Kostimulation der T-Zellen basieren, erfolversprechender (Toh, et al., 2007), wie z.B. Abatacept. Dabei handelt es sich um ein Konstrukt aus cytotoxischen T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA4), fusioniert mit dem Fc-Teil eines Immunglobulin-G-Moleküls (CTLA-4-Ig). Dieses bindet an die kostimulatorischen Elemente CD80 und CD86 auf APCs und verhindert deren Interaktion mit ihren Rezeptoren auf T-Zellen. Abatacept ist eine effektive und anerkannte Behandlungsmöglichkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Kremer, et al., 2006).

Die B-Zell-basierte Therapie mit Rituximab, das an CD20 bindet, zeigt eine gute Effizienz in Patienten mit rheumatoider Arthritis, benötigt jedoch eine Begleitbehandlung mit Methotrexat (MTX) oder Zyklophosphamid (Vita, et al., 2002; Emery, et al., 2006). Zelladhäsionsmoleküle, wie ICAM-1, $\alpha 4/\beta 1$ Integrine und CD11 sind Ziele, um die Kostimulation und Migration von inflammatorischen Zellen in das Gelenk zu verhindern. Chemokin-Rezeptor-Antagonisten wurden hergestellt, um CCR1, RANTES und IL8 zu blockieren und damit die Migration von inflammatorischen Zellen in das Synovium zu verhindern. Kombinationen aus Angiogenese und Adhäsionsinhibitoren wie anti- $\alpha v/\beta 3$ sind ebenfalls in der Evaluierung (Sweeney, et al., 2004).

Um eine Gelenkschädigung zu verhindern, wurden Metalloproteinase-Inhibitoren getestet, zeigten jedoch wenig Effizienz und zahlreiche Nebenwirkungen, wie z.B. verstärkte Fibrose. Die Inhibierung von Enzymen wie iNOS und COX-2 ist ebenfalls eine potentielle therapeutische Strategie, um die Bildung von inflammatorischen Mediatoren und die Gelenkschädigung zu verhindern. Osteoprotegerin könnte die Gelenkschädigung verhindern oder heilen, indem es die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten inhibiert (Sweeney, et al., 2004).

Eine weitere Strategie, die verfolgt wird, ist die Kombination verschiedener Biologika, um additive Effekte zu erzielen und mehrere Wege, die in die Entwicklung der Krankheit involviert sind, zu inhibieren. Leider zeigten weder die Kombination der Inhibition verschiedener Zytokine noch verschiedener Wege klinische Vorteile. Gegenteilige Effekte, besonders die Infektionsraten, waren aufgrund der Inhibition von zwei Zielen erhöht (Scheinecker, et al., 2008).

1.4.4 Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung von rheumatoider Arthritis

Obgleich mit den Biologika gute therapeutische Effekte erzielt werden können, haben sie eine relativ kurze Halbwertszeit und benötigen häufige systemische Applikationen, um effektiv wirken zu können (Olsen, et al., 2004). Außerdem ist die rheumatoide Arthritis durch eine variable Krankheitsaktivität gekennzeichnet mit spontanem Nachlassen und Wiederauftreten der Gelenkentzündung, was bei Behandlungen mit herkömmlichen Medikamenten und Biologika nicht berücksichtigt werden kann (Van de Loo, et al., 2004). Mit gentherapeutischen Strategien könnten einige dieser Limitierungen umgangen werden, da therapeutische Transgene über einen langen Zeitraum und kontrolliert systemisch oder direkt im arthritischen Gelenk freigesetzt werden könnten und so sowohl die Effizienz erhöhen als auch die Nebenwirkungen der Therapie reduzieren könnten (Van de Loo, et al., 2004; Traister, et al., 2008). Die lokale Administration ist insofern vorteilhaft, weil das potentielle Risiko für Nebenwirkungen geringer ist und die Behandlung direkt im Gelenk und damit am Ort der Entzündung stattfindet. Dabei würden jedoch systemische Eigenschaften der Krankheit unbehandelt bleiben. Systemische Behandlungen, die üblicherweise durch eine intravenöse Injektion erfolgen, haben den Vorteil, dass eine weitreichendere, therapeutische Wirkung erzielt werden kann, ist jedoch gleichzeitig mit einem höheren Risiko für Nebenwirkungen und Toxizität verbunden (Traister, et al., 2008).

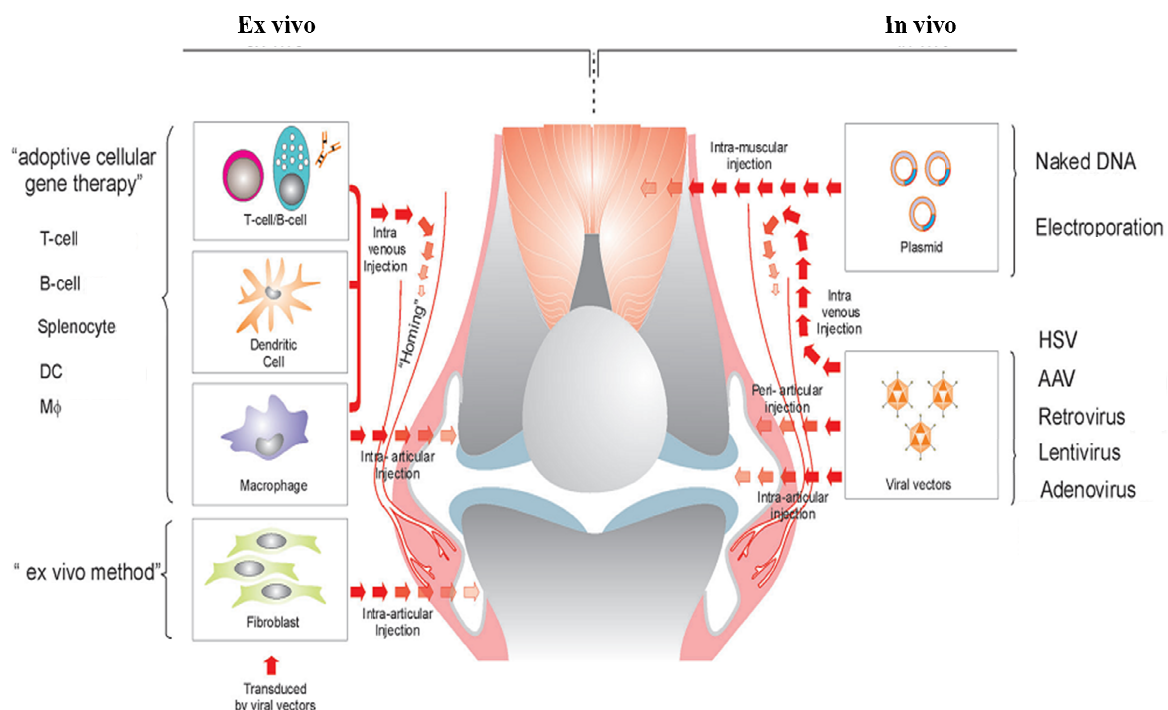


Abbildung 1-9 | Schematische Darstellung verschiedener Gentransfermethoden. Bei der Gentherapie steht der Transfer des therapeutischen Gens zum Ort der Entzündung im Vordergrund. Bei der ‚ex vivo‘ Methode werden autologe oder allogene Fibroblasten, die durch virale Vektoren verändert wurden, in das arthritische Gelenk injiziert. Die ‚adaptive, zelluläre Gentherapie‘ basiert auf der Verwendung von viral veränderten Zellen, die in der Lage sind, zum Ort der Entzündung zu wandern wie T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen oder Makrophagen. Der ‚in vivo‘ Gentransfer beruht auf der direkten Applikation des therapeutischen Genkonstrukts (viral oder nicht-viral). Dies kann entweder lokal (intra- oder peri-artikulär) oder systemisch (intravenös, intramuskulär) erfolgen (Van de Loo, et al., 2004).

Weiterhin muss zwischen *ex vivo*- und *in vivo*-Behandlungen unterschieden werden (Abbildung 1-9, S.22). *In vivo*-Strategien basieren auf der direkten, systemischen oder lokalen Applikation des therapeutischen Genkonstrukts (viral oder nicht-viral) und haben den Vorteil, dass sie relativ einfach durchzuführen und weniger kostenaufwendig sind. *Ex vivo*-Strategien beinhalten die virale Veränderung von verschiedenen zuvor isolierten Zelltypen, die dem Patienten dann injiziert werden. Dies ist wesentlich aufwendiger und teurer, hat jedoch den Vorteil, dass spezifische Zelltypen ausgewählt werden können, sodass eine mögliche genetische Modifikation von Stammzellen durch den Gentransfervektor, die in der Aktivierung von Onkogenen resultieren kann, vermieden werden kann. Von einer „zellulären, adaptiven Gentherapie (ACGT)“ wird gesprochen, wenn für die *ex vivo*-Transduktion Zellen verwendet werden, die in der Lage sind zum Ort der Entzündung zu wandern und intravenös appliziert werden können, wie Splenozyten, T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen. Fibroblasten hingegen besitzen diese Eigenschaft nicht und müssen nach der *ex vivo*-Modifikation direkt ins Gelenk gespritzt werden (Van de Loo, et al., 2004; Traister, et al., 2008).

Ein kritischer Punkt für den Erfolg der Gentherapie sind die verwendeten Vektoren, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können: viral und nicht-viral. Bei nicht-viralem Gentransfer wird häufig Plasmid-DNA als Vektor verwendet und durch Liposomen, eine Genkanone, Elektroporation oder direkte Injektion zugeführt. Plasmid-DNA ist weniger toxisch und immunogen sowie leicht und günstig produzierbar, hat jedoch den Nachteil, dass die Transfektionseffizienz relativ gering ist und die Expression des Transgens nur über einen kurzen Zeitraum (1-2 Wochen) erfolgt (Traister, et al., 2008). Am häufigsten werden in Tiermodellen virale Vektoren für den Gentransfer verwendet wie Adenoviren (AV), Retroviren, Lentiviren (LV) und Adeno-assoziierte Viren (AAV). Jedes virale System hat seine spezifischen Vor- und Nachteile (Tabelle 1-3, S.23), wobei für die Anwendung in chronischen Autoimmunerkrankungen nicht-immunogene Vektoren notwendig sind, da die Genexpression über einen langen Zeitraum erfolgen soll. Zellen, die mit einem immunogenen Vektor transfiziert wurden, werden innerhalb von 2-3 Wochen durch zytotoxische Lymphozyten zerstört, sodass der nützliche Effekt nur kurzfristig wäre (Chernajovsky, et al., 2004).

Tabelle 1-3 | Eigenschaften von viralen Vektoren, die für die Gentherapie genutzt werden.

(Quelle verändert nach Chernajovsky, et al., 2004)

Vektor	Immunogenität	Integration	Expressionsdauer	Vorteile	Nachteile
Adenovirus	hoch	nein	6 Wochen	Sehr stabil; gut für kurzzeitige <i>in vivo</i> -Expression	Keine Infektion von Lymphozyten; mehr als 50% der Menschen haben bereits bestehende Antikörper
AAV	gering	selten	Bis zu einem Jahr	Gut für Langzeit-Expression	Geringe Insertgröße; 30% der Menschen haben bereits bestehende Antikörper
HSV	hoch	nein	6 Monate	Kann viele Gene exprimieren; hauptsächlich neurotroph <i>in vivo</i>	Induziert zelluläre Toxizität und Entzündung
Retrovirus	gering	ja	Für das Leben der Zelle	Hat <i>ex vivo</i> -Anwendungen	Kann Insertionseffekte zur Folge haben
Lentivirus	Gering	ja	Für das Leben der Zelle	Kann in hohen Titern produziert werden	Kann Insertionseffekte zur Folge haben

Um die Transgenexpression der variablen Krankheitsaktivität anpassen zu können, gibt es verschiedene Regulationssysteme. Das Tetrazyklin-System (siehe 2.5.2 Regulation der Transgenexpression: Das Tet-System, S. 49) ist dabei das am häufigsten verwendete System, wobei die Genexpression unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierten Promotors steht und üblicherweise mit dem Tetrazyklin-Analogon Doxyzyklin induziert wird. Die klinische Anwendung dieses Systems würde allerdings eine ständige Kontrolle der Krankheitsaktivität benötigen, um die Transgenexpression über die Gabe von Doxyzyklin anzupassen (Chernajovsky, et al., 2004; Moitz, et al., 2006).

Alle gentherapeutischen Ansätze wurden bereits in Tiermodellen der Arthritis getestet und zeigten gute Ergebnisse (Van de Loo, et al., 2004). Gentherapeutische Ziele sind dabei einerseits Zytokine und andererseits die Modifikation verschiedener, an der Arthritis beteiligter Zelltypen. Durch die gezielte Veränderung von Zytokinen soll das Zytokinegleichgewicht in der Arthritis wiederhergestellt werden, um den Entzündungsprozess zu mildern und/oder die Zerstörung von Knochen und Knorpel anzuhalten. Ansätze hierfür sind die Inhibition proinflammatorischer Zytokine (Expression von IL-1Ra, sTNFR, sIL-1RAcP, TNF-Antikörper), die Expression anti-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 und TGF β) und die Beeinflussung intrazellulärer Signalwege (NF κ B und gp130). Das Targeting von Zellen beinhaltet die gezielte Eliminierung von Zellen aus dem entzündeten Gelenk, um die Entzündung zu mildern. Dies kann über die Induktion von Apoptose (TRAIL, FasL) oder die genetische Synvektomie (p53, HSV-TK, CRAds, p16/p21) erfolgen. Letztere basiert auf dem Abtöten von transformierten synovialen Fibroblasten, die das Bindegewebe zerstören. Die Inhibition der Angiogenese (Endostatin, Angiostatin, Urokinase, Plasminogen-Inhibitor) resultiert in verminderter Pannusbildung und synovialer Hyperplasie (Van de Loo, et al., 2004; Chernajovsky, et al., 2004; Traister, et al., 2008).

1.5 siRNA für die Gentherapie in Arthritis

Neben den gentherapeutischen Ansätzen, die auf der Überexpression von Genen basieren, hat sich mit der immer weiter voranschreitenden siRNA-Technologie eine weitere Strategie der Genexpressionskontrolle eröffnet, die auch für klinische Anwendungen enormes Potential aufweist. Die therapeutische Anwendung von siRNAs befindet sich in der klinischen Entwicklungsphase für verschiedene Krankheiten wie der Makuladegeneration (Shen, et al., 2006; Cashman, et al., 2006), Hepatitis B (Wu, et al., 2005) und C (Kim, et al., 2006), Asthma (Popescu, 2005), Chorea Huntington (Wang, et al., 2005), Diabetes (Xu, et al., 2007; Xu, et al., 2005) und Krebs (Chen, et al., 2006; Filieure, et al., 2003). Studien bezüglich der Nützlichkeit von siRNA-basierten Therapien für die Behandlung von rheumatoider Arthritis werden derzeit evaluiert.

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlich vorkommender Mechanismus zur sequenzspezifischen Inhibierung der Genexpression, der von eukaryotischen Zellen verwendet wird, um die Expression endogener Gene zu hemmen. Dieser Mechanismus kann sich beim Studium von Genfunktionen in der Wissenschaft zu Nutze gemacht werden, was 1998 erstmals für *C. elegans* von Fire und Mello beschrieben wurde (Fire, et al., 1998). Doppelsträngige RNA wird von dem RNase Enzym Dicer in eine sogenannte small-interfering RNA (siRNA) gespalten, die eine Länge von ~21 Nukleotiden hat. Innerhalb des Zytoplasmas der Zelle wird

die doppelsträngige RNA durch einen Multiproteinkomplex, den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC), gespalten. Der antisense Strang bleibt an den RISC-Komplex gebunden, hybridisiert spezifisch mit homologen messenger RNA (mRNA) Sequenzen im Zytoplasma und induziert die Spaltung der mRNA, die dann durch zelluläre Ribonukleasen abgebaut wird (Elbashir, et al., 2001; Khoury, et al., 2007).

Die Verwendung von siRNAs zur Inhibierung des korrespondierenden Proteins ist *in vitro* schon zu einer Standardtechnik geworden. *In vivo*-Applikationen sind hingegen immer noch problembehaftet, da Stabilität und intrazelluläre Aufnahme der siRNA noch optimiert werden müssen, wobei die Induktion von Nebenwirkungen wie die Aktivierung des Immunsystems und pro-inflammatorischer Signalwege, vermieden werden sollte (Khoury, et al., 2007).

Die Behandlung von rheumatoider Arthritis mittels siRNA kann sowohl systemisch durch intravenöse Applikation als auch lokal durch die Injektion in den Gelenkspalt erfolgen. Zielzellen sind dabei zirkulierende Immunzellen sowie residente Synoviozyten und aktivierte Immunzellen, die in das entzündete Gelenk einwandern. Für eine effektive Aufnahme in die Zielzellen müssen die siRNAs zum einen vor dem Abbau durch RNasen geschützt werden und zum anderen so modifiziert werden, dass sie von den Zielzellen aufgenommen werden können (Khoury, et al., 2007). „Nackte“ siRNAs sind aufgrund ihrer negativen Ladung nicht in der Lage, die Zellmembranen zu durchdringen und ins Zytoplasma zu gelangen. Neben der Verwendung von viralen Gentransfervektoren gibt es eine Anzahl von nicht-viralen Ansätzen, um die Stabilität zu erhöhen und Aufnahme in die Zielzellen zu ermöglichen, wie chemische siRNA-Stabilisierung oder Modifikation, die Umschließung der siRNA mit Liposomen (Sioud M, 2003) und die Bindung der siRNA an kationische oder andere Trägerpartikel (Crombez, et al., 2007; Howard, et al., 2006). Um die Aufnahme der siRNA *in vivo* in die Zellen zu ermöglichen, konnten gute Ergebnisse bei systemischer oder lokaler Injektion mit kationischen Liposomen erzielt werden (de Fougères, et al., 2007). Liposomen sind Vesikel mit einem wässrigen Kompartiment, das von einem Phospholipid-Bilayer umgeben wird und die mit Zellmembranen über Endozytose fusionieren können. Wenn die Lipide mit Nukleinsäuren einen Komplex bilden, werden sie als Lipoplex bezeichnet.

Dabei konnte von Khoury et al. 2006 gezeigt werden, dass der Silencing Effekt der siRNA *in vivo* deutlich durch die Verwendung eines speziellen Liposomengemisches (RPR209120/DOPE) zusammen mit einer Träger-DNA gesteigert werden kann. Das Liposomengemisch ist für eine effektivere Aufnahme in die Zielzellen verantwortlich, während die Träger-DNA zusätzlichen Schutz vor dem Abbau der RNA bietet. So konnte durch die intravenöse Injektion des kationischen Lipoplex-DNA-Gemisches zusammen mit einer siRNA gegen TNF α in Mäuse mit Kollagen-induzierter Arthritis die Produktion von TNF α systemisch und lokal im Kniegelenk inhibiert werden, was mit einer kompletten Heilung der Arthritis einherging. Eine Analyse der Biodistribution der so komplexierten siRNA zeigte, dass hauptsächlich Zellen in Leber, Lunge und Milz und zu einem geringeren Prozentsatz auch in den Gelenken von der siRNA erreicht wurden (Khoury, et al., 2006).

Die Tatsache, dass bereits verschiedene RNAi-Therapeutika in menschlichen, klinischen Tests sind, zeigt, dass die RNAi-Technologie nicht nur theoretisch, sondern bereits in der Praxis klinische Anwendung in der Behandlung von Krankheiten findet. Inwieweit eine The-

rapie der rheumatoiden Arthritis durch RNAi-Behandlungen möglich sein wird, wird die Zukunft zeigen. Erste Versuche an Tiermodellen waren erfolgversprechend, wobei Stabilität und Expressionsdauer immer noch die Hauptprobleme darstellen.

1.6 TAK1 als therapeutisches Ziel?

Die TGF- β -aktivierte Kinase-1 (TAK1, MEKK7) ist ein Mitglied der MAP3K-Familie und kann durch zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β (Ninomiya-Tsuji, et al., 1999), IL-18 (Wald, et al., 2001), TNF α (Shim, et al., 2005) und RANKL (Mizukami, et al., 2002) aktiviert werden und nimmt damit eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von inflammatorischen Signalen ein (Abbildung 1-10, S.26).

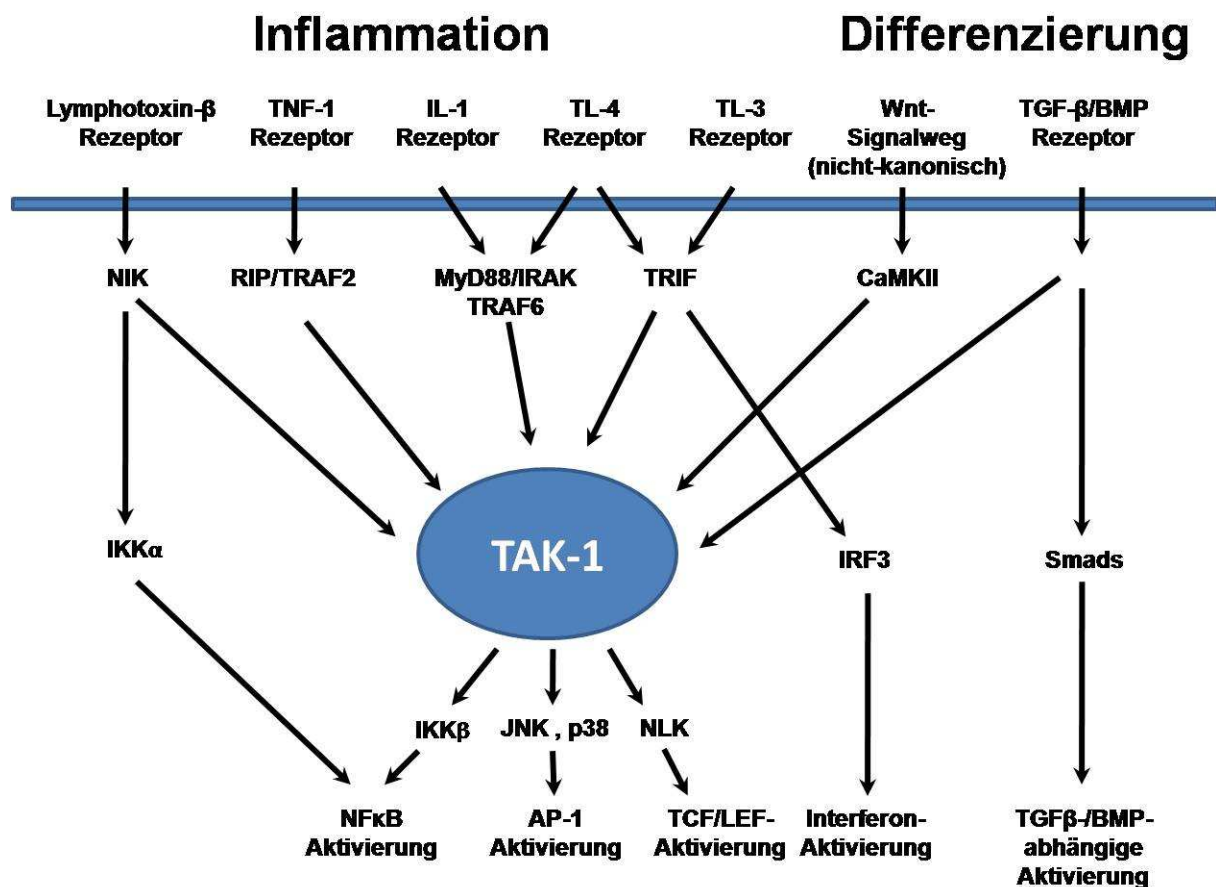


Abbildung 1-10 | Signalwege der TGF- β -aktivierten Kinase 1 (TAK-1). Die MAP3K TAK1 ist an der Weiterleitung von zahlreichen inflammatorischen und bakteriellen sowie viralen Signalen beteiligt. IL-1 β , TNF α und bakterielle oder virale Komponenten wie z.B. LPS aktivieren durch die Bindung an ihre Zelloberflächenrezeptoren über intrazelluläre Signalwege TAK1, das die Aktivierung der MAPK-Signalwege JNK und p38 sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B über IKKs vermittelt. Dem Namen nach wurde TAK1 als eine in den TGF- β -Signalweg involvierte Kinase beschrieben. TAK1 ist ebenfalls über die Signalweiterleitung von BMP und TGF- β -Signalen an Differenzierungsprozessen beteiligt (Hoffmann, et al., 2005; Shim, et al., 2005).

Durch die Bindung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF α an ihre Zelloberflächenrezeptoren IL-1R1 bzw. TNFR werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die über die Aktivierung von TAK1 zur Aktivierung der MAPK p38 und JNK und damit zu AP-1 (Aktivator-Protein-1) führen. TAK1 aktiviert ebenfalls IKK (Inhibitor der κ B-Kinase), was zur Freisetzung und Translokation von NF κ B in den Zellkern führt (Ninomiya-Tsuji, et al., 1999).

Sowohl die MAPK Signalwege p38 und JNK als auch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB sind bei der Vermittlung inflammatorischer Signale während der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis von zentraler Bedeutung und liegen in einer aktivierten Form im rheumatoiden Synovium vor (vgl. 1.2.7, S.14). Die Expression zahlreicher Gene, die am Erhalt und Fortschreiten der Entzündung sowie der Gewebedegeneration beteiligt sind, werden durch diese Signalwege vermittelt, wie TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, Cyclooxygenase-2, induzierbare Nitritoxid-Synthetase und diverse Matrixmetalloproteinasen (MMPs), wie MMP-3 und MMP-13 (Schett, et al., 2000).

Eine Rolle von TAK1 in der Signalvermittlung unter rheumatischen Bedingungen konnte 2007 durch Hammaker et al. gezeigt werden. Eine Inhibierung von TAK1 in IL-1β stimulierten synovialen Fibroblasten führte zu einer Unterdrückung der JNK-Kinase-Funktion und damit zu einer verminderten AP-1-Aktivität. Ebenfalls war durch die Abwesenheit von TAK1 die IL-1β-induzierte Genexpression von MMP-3 und IL-6 in diesen Zellen vermindert. TAK1 spielt somit eine wichtige Rolle bei der IL-1β-abhängigen Signalweiterleitung in synovialen Fibroblasten und stellt damit ein potentielles, therapeutisches Ziel dar, um die Aktivität von synovialen Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis zu beeinflussen (Hammaker, et al., 2007). Neben diesem direkten Hinweis auf eine Beteiligung von TAK1 an der Signalweiterleitung in der rheumatoiden Arthritis gibt es zahlreiche weitere Hinweise. So wird TAK1 im normalen sowie von Osteoarthritis betroffenen, humanen Knorpel exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle bei der IL-1-induzierten Freisetzung von MMP-13, MMP-1 und TNFα. TNFα ist ein Schlüsselzytokin in inflammatorischen Prozessen, während MMP-13 eine Hauptprotease in der Knorpeldegradation darstellt. Eine Inhibierung von TAK1 könnte also auch den Einfluss von IL-1β auf Knorpelzellen und damit auf die Gelenkdegradation in rheumatoider Arthritis haben (Klatt, et al., 2006). TAK1 ist ebenfalls in TNFα-induzierte Signalwege involviert und beeinflusst die TNFα-induzierte Freisetzung von MMP-9 und die Aktivität von NFκB sowie AP-1 in Muskelzellen (Srivastava, et al., 2007). Eine Beteiligung an der Regulation der Entwicklung und Funktion von Osteoklasten durch TAK1 ist ebenfalls wahrscheinlich. RANK- und RANKL-induzierte NFκB Signalwege werden durch eine dominant-negative Form von TAK1 (dnTAK1) inhibiert und eine Stimulation mit RANKL induziert die Aktivierung von TAK1 (Mizukami, et al., 2002).

Neben der Vermittlung von NFκB- und JNK-Signalen des angeborenen Immunsystems durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und inflammatorischer Antworten, ausgelöst durch TNFα und IL-1β (Shim, et al., 2005), weist TAK1 auch eine Funktion in der adaptiven Immunität auf (Sato, et al., 2005). Studien an Jurkat-T-Zellen und DT40-B-Zellen zeigen, dass TAK1 an der T-Zell Rezeptor (TCR)- und B-Zell-Rezeptor (BCR)-vermittelten Aktivierung von NFκB beteiligt ist (Shinohara, et al., 2005; Sun, et al., 2004). In primären B-Zellen hingegen scheint TAK1 für die NFκB Aktivierung entbehrlich zu sein (Sato, et al., 2005). In den zentralen Zellen des adaptiven Immunsystems, den T-Lymphozyten, ist TAK1 jedoch ein wichtiger Mediator für Entwicklung, Überleben und Funktion. TAK1 ist für die Entwicklung von Thymozyten und regulatorischen T-Zellen essentiell. In reifen Thymozyten ist TAK1 für die T-Zell-Rezeptor vermittelten zellulären Immunantworten und die Aktivierung von NFκB und JNK notwendig, wohingegen in Effektor-T-Zellen die T-Zell-Rezeptor vermittelte Produktion von Zytokinen durch die Abwesenheit von TAK1 nicht beeinflusst wird und nur eine geringe

Verminderung der JNK-Aktivität zu verzeichnen ist. Die Deletion von TAK1 in Effektor-T-Zellen führt zu einer gestörten Proliferation und Aktivierung von p38 bei Stimulation mit γ c (gamma-Ketten)-Rezeptor abhängigen Zytokinen wie IL-2, IL-7 und IL-15 (Wan, et al., 2006). Bei der Reifung von Thymozyten führt die Inhibierung von TAK1 zu einer gestörten Entwicklung, wobei die T-Zellen die Entwicklung vom doppel-positiven (DP) Stadium ($CD4^+CD8^+$) in das single-positive (SP) Stadium ($CD4^+$ oder $CD8^+$) nicht überleben. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion von naiven T-Zellen in den peripheren Geweben (Liu, et al., 2006).

Wie der Name bereits impliziert, ist TAK1 jedoch nicht nur an der Vermittlung von inflammatorischen Signalwegen, sondern auch an TGF- β - und BMP-abhängigen Signalwegen in der Differenzierung beteiligt (Abbildung 1-10, S.26). Ursprünglich wurde TAK1 als Regulator der p38- und JNK-MAPK-Aktivierung in TGF- β -induzierten Signalwegen entdeckt (Yamaguchi, et al., 1995), ist jedoch auch in Signalwege des „Bone morphogenetic Proteins“ (BMP) involviert, wie Studien an der Embryonalentwicklung von *Xenopus* gezeigt haben (Shibuya, et al., 1998). TAK1 ‚knock-out‘-Mäuse sind embryonal lethal und zeigen extreme Abnormalitäten bei der Entwicklung des Neuralrohrs (Shim, et al., 2005). TAK1 interferiert mit der Differenzierung von murinen mesenchymalen Progenitorzellen (C3H10T $\frac{1}{2}$), wobei die BMP-induzierte Osteogenese durch die Anwesenheit einer Wildtyp-Form von TAK1 (wtTAK1) inhibiert wird, während dnTAK1 die Differenzierung fördert (Hoffmann, et al., 2005).

1.7 Ziel der Arbeit

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine chronische Entzündung der Gelenkinnenhaut (Synovitis) zu erheblichen Schmerzen führt, verbunden mit dem Abbau von Knochen und Knorpel im Gelenk. Obgleich die genaue Ursache und Pathologie der Krankheit bisher noch nicht bekannt ist, hat es im Bereich der Rheumaforschung erhebliche Fortschritte im Bezug auf die beteiligten Faktoren, Zelltypen und Signalwege gegeben. Diese haben zu großen Behandlungserfolgen mit Hilfe von TNF α -Blockern und anderen Biologika geführt. Dennoch dienen diese nur einer Linderung der Krankheit und können sie nicht heilen. Des Weiteren spricht eine Vielzahl der Patienten nicht auf die Therapieformen an, was die Suche nach neuen Strategien und therapeutischen Zielen vorantreibt. Gentherapeutische Ansätze, die besser auf die Krankheitsumstände, wie den polyphasischen Verlauf, angepasst werden können, befinden sich in klinischen Entwicklungsphasen. Eine relativ neue Strategie der Gentherapie liegt hierbei in der Verwendung von RNA-Inhibitoren, um gezielt inflammatorische Faktoren, die bei der Entstehung und Entwicklung der Gelenkentzündung eine Rolle spielen, zu inhibieren. Die Tatsache, dass viele der entzündlichen sowie degenerativen Prozesse durch MAPK- und NF κ B-Signalwege in den verschiedenen beteiligten Zelltypen wie synoviale Makrophagen und Fibroblasten, T-Zellen, Osteoklasten, Chondrozyten etc. eine essentielle Rolle spielen, macht diese zu einem attraktiven therapeutischen Ziel.

Unter den vielen an diesen Signalwegen beteiligten Faktoren nimmt die TGF- β -aktivierte Kinase (TAK1) eine Schlüsselrolle ein, da sie nicht nur an den Signalwegen der angeborenen und erworbenen Immunität, sondern auch an Inflammations- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist. Deshalb könnte TAK1 ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis sein, und zwar nicht nur im Hinblick auf die Einschränkung der Entzündung, sondern auch durch eine Verminderung der Gelenkdegradation bei einer gleichzeitigen Förderung der Regeneration. Aufgrund dieser Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von TAK1 bzw. der Inhibierung von TAK1 mittels siRNA auf ein *in vivo*-Modell der rheumatoiden Arthritis - speziell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) - und mögliche molekulare und zelluläre Mechanismen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Isolierung von RNA

Zur Isolation von RNA aus Zellen und Geweben wird das TRI-Reagent® (RNA/DNA/Protein Isolation Reagent, Invitrogen) eingesetzt. Mit diesem Reagenz können gleichzeitig RNA, DNA und Proteine aus Zellen beziehungsweise Gewebeproben isoliert werden. Das Prinzip basiert auf der Single-Step-RNA-Isolationsmethode (Chomczynski, et al., 1987), bei der Guanidin-thiocyanat (GTC) und Phenol für die Lysierung der Zellen und die gleichzeitige Inaktivierung endogener RNAsen zum Einsatz kommen. GTC ist ein chaotropes Salz, das Proteine denaturiert und inaktiviert – auch RNasen. Mit Hilfe des Phenols werden die Proteine entfernt, und durch eine Absenkung des pH-Wertes lösen sich auch kleinere DNA-Fragmente in dem sauren Phenol. Die größeren DNA-Fragmente sammeln sich nach Zentrifugation in der Interphase. Die RNA befindet sich dann in der wässrigen Oberphase.

Für die Isolation werden die Zellen/das Gewebe mit einer entsprechenden Menge TRIzol-Reagent® versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat kann bei -70°C gelagert werden. Zur Abtrennung der RNA von Proteinen und DNA wird das Lysat mit 1-Brom-3-Chlorpropan (BCP) versetzt (1/10 des Volumens von TRIzol), 15 Sekunden geschüttelt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 18.000 x g und 4°C entstehen 2 Phasen: eine wässrige Phase, die die RNA enthält, und eine organische Phase (phenolhaltig) mit Proteinen. In der Interphase befindet sich die genomische DNA. Die obere RNA-haltige Phase wird abgetrennt und mit der 0,6- bis einfachen Menge Isopropanol präzipitiert. Die Probe wird dann für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 20.000 x g und 4°C für 30 Minuten pelletiert. Der Überstand wird mit einer Kapillare abgenommen und die RNA mit 500µl 80%igem Ethanol in 0,1% DEPC-Wasser gewaschen. Nach 15 Minuten Zentrifugation (20.000xg, 4°C) wird das Ethanol abgenommen, das Pellet bei RT getrocknet, in 20µl zweifach autoklaviertem, 0,1%igem DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 58°C inkubiert. Die RNA kann dann bei -70°C gelagert werden. In 1:50- bis 1:100- Verdünnungen wird bei 260nm die RNA-Konzentration bestimmt ($\text{O.D.}_{260\text{nm}} \cdot x$ (Verdünnung) $\cdot 40 = \text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Anschließend kann die mRNA als Bestandteil der gesamten RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden.

2.1.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgt nach der modifizierten Methode von Gubler und Hoffman (Gubler, et al., 1983). Der Anteil von mRNA an der gesamten zellulären RNA beträgt ca. 1-2 %. Diese wird selektiv durch Einsatz von Oligo-(dT)-Primern, die an die 3'-PolyA-Enden der mRNA binden, durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die gewünschte Menge an RNA (nach Möglichkeit 5µg) wird mit 0,1%igem DEPC-Wasser versetzt, so dass das Endvolumen 11,6µl beträgt. Nach Zugabe von 1µl Oligo-(dT)12-18-Primern wird

die RNA bei 70°C für 10 Minuten denaturiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, und anschließend für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wird ein Prämix aus 4µl 5fach RT-Puffer, 2µl 0.1 M DTT, 1µl dNTP (je 10 mM) und 0.4µl RNasin[®] zu dem Ansatz gegeben. Nach 2 Minuten Inkubation bei 37°C wird 1µl reverse Transkriptase M-MLV (200 U/µl) hinzugefügt und damit die reverse Transkription gestartet. Nach 60-90 Minuten bei 37°C wird die reverse Transkriptase 5 Minuten bei 90°C inaktiviert und der Ansatz mit 40µl TE-Puffer versetzt.

2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA wird die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis, et al., 1987) angewendet. Hierbei wird ein kurzer, genau definierter Teil einer DNA-Sequenz mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert. Neben dem Primerpaar und der Matritzen-DNA enthält der Reaktionsansatz noch dNTPs (Desoxyribonucleotidtriphosphate) zur Synthese des neuen DNA-Stranges, eine hitzestabile DNA-Polymerase, welche den neuen DNA-Strang synthetisiert und Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase optimale chemische Umgebung schaffen.

Die PCR ist ein zyklisches Reaktionsgeschehen, welches aus folgenden drei Schritten besteht:

I. Strangtrennung:

Durch kurzzeitiges Erhitzen der DNA-Lösung auf 94°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen der DNA voneinander getrennt.

II. Anlagerung der Primer (Annealing)

Die DNA-Lösung wird auf die so genannte Annealingtemperatur abgekühlt, sodass sich die Primer an den komplementären Sequenzbereichen der einzelsträngigen DNA anlagern können. Die Annealingtemperatur ist dabei primerspezifisch und wird aus deren Sequenz berechnet. Die Primer werden außerdem in großem Überschuss eingesetzt, wodurch verhindert wird, dass sich die ursprünglichen DNA-Stränge wieder miteinander verbinden.

III. DNA-Synthese

Die DNA-Lösung wird auf die optimale Reaktionstemperatur (72°C) der DNA-Polymerase erhitzt. Die Polymerase stellt nun eine Kopie der Ausgangs-DNA her, wobei die beiden Primer als Ansatzstellen dienen und in 5' → 3' Richtung verlängert werden.

Diese drei Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt (20-35 Zyklen), wobei die für jeden dieser Schritte erforderliche Temperatur automatisch durch einen Thermozykler eingestellt wird. Die in jedem Zyklus neu synthetisierten DNA-Stränge können ihrerseits im nächsten Zyklus als Matrize dienen, sodass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA kommt (2^n -fache Vermehrung bei n-Zyklen).

2.1.3.1 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird zunächst RNA in cDNA umgeschrieben (2.1.2 cDNA-Synthese), welche anschließend als Matrize für eine PCR eingesetzt wird. Für die RT-PCR gibt es viele

Anwendungsmöglichkeiten, z.B. kann die Expression eines Gens in bestimmten Zellen oder Geweben nachgewiesen werden.

Standard-PCR-Ansatz (20µl):

2 µl	MgCl ₂ (25mM)
1 µl	5x – Puffer (25mM)
0,4 µl	dNTPs
1 µl	vorwärts –Primer (5µM)
1 µl	rückwärts – Primer (5µM)
0,1 µl	GoTaq-Polymerase (5U/µl)
1 µl	Template-DNA (10ng/µl)
12,5 µl	H ₂ O
<hr/>	
20 µl	

Standard-PCR-Programm:

1.30 Min.		94°C	} 25-35 Zyklen
20 Sek.	Strangtrennung	94°C	
20 Sek.	Primer-Annealing	x °C	
30 Sek.	DNA-Synthese	72°C	
15.00 Min.		72°C	
∞		15°C	

2.1.3.2 Quantitative PCR (qPCR)

Für die quantitative Analyse der Expression verschiedener Gene wird die quantitative PCR (qPCR) eingesetzt. Hierzu wird das LightCycler® 480 System von Roche verwendet. Das Prinzip basiert auf Detektion und Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte schon während der Amplifikation. Dies geschieht mit Hilfe eines Reporter-Fluorochroms, dessen Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte in der Reaktion ansteigt. SYBR-Green ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die kleine Grube der DNA-Helix einlagert. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass alle doppelsträngigen PCR-Produkte markiert werden, weswegen eine Schmelzkurvenanalyse nach der Amplifikation zur Differenzierung von spezifischen und nicht-spezifischen PCR-Produkten notwendig ist.

Mit Hilfe der qPCR kann sowohl eine absolute als auch eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. In dieser Arbeit kommt ausschließlich die relative Quantifizierung zum Einsatz. Dabei wird Menge des Zielgens einer unbekannten Probe relativ zu einem anderen Gen-Produkt, einem sogenannten Housekeeping-Gens, das als konstant angesehen wird, angegeben. Die relative Quantifizierung berechnet die Konzentration des Zielgens relativ zu der nicht-regulierten Referenz und das Ergebnis wird als Verhältnis Zielgen/Referenz ausgedrückt.

Nach Isolation der RNA mit Hilfe des TRI-Reagent® (2.1.1, S.30) aus dem zu analysierenden Zellmaterial erfolgt eine cDNA-Synthese (2.1.2, S.30). Die cDNA wird als Template für die qPCR eingesetzt, wobei eine Menge von ≤ 500ng pro Reaktion eingesetzt wird. Alle Kompo-

nenten im PCR Ansatz werden im Überschuss eingesetzt, um eine Limitierung der Amplifikation und eine damit einhergehende Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

Ein Standard-PCR-Ansatz für die qPCR enthält folgende Komponenten:

Standard PCR-Ansatz (20µl):

10 µl	SYBR-Green Master Mix
1 µl	Primer A (0,5µM)
1 µl	Primer B (0,5µM)
7 µl	DEPC-Wasser
1 µl	cDNA (<500ng)
<hr/>	
20 µl	

Im SYBR-Green Master-Mix (Qiagen®) sind neben einer HotStarTaq-DNA-Polymerase, ein entsprechender PCR-Puffer, dNTPs und der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green enthalten. Für die Reaktion müssen entsprechende Primer, die Template-DNA und DEPC-Wasser hinzugegeben werden. Die Primer sind dabei so konstruiert, dass ein Amplifikat zwischen 150-200bp entsteht und die Annealing-Temperatur für alle Primer identisch ist und bei 60°C liegt. Alle Komponenten für die PCR werden in eine 96-wp (Roche®) pipettiert, wobei für jede Probe Doppel- bis Dreifachbestimmungen durchgeführt werden, um eine statistische Analyse zu ermöglichen. Für die relative Quantifizierung wird das Housekeeping-Gen GAPDH eingesetzt und ebenfalls Doppel- bis Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Standard-PCR-Programm:

1.30 Min.		94°C	} 45 Zyklen
20 Sek.	Strangtrennung	94°C	
20 Sek.	Primer-Annealing	60°C	
30 Sek.	DNA-Synthese	72°C	
<hr/>			
15.00 Min.		72°C	
∞		40°C	

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt über die LightCycler-480 Software, wobei die Expression des Zielgens gegen die Expression des Housekeeping-Gens abgeglichen wird. Die Daten werden mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 in entsprechenden Diagrammen dargestellt und statistisch ausgewertet.

2.1.4 Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung von DNA

Durch die Phenol-Chloroform-Extraktion wird die DNA-Lösung von Verunreinigungen (meist Proteinen) befreit und entsalzt. Verschmutzungen werden denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase bzw. der Grenzschicht zwischen der organischen und der wässrigen Phase an. Die DNA bleibt in der wässrigen Phase. Dabei wird das Volumen der DNA-Lösung zunächst auf 100 µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 µl einer fertigen Lösung aus 50% (v/v) Phenol, 48% (v/v) Chloroform und 2% (v/v) Isoamylalkohol wird die Mischung vorsichtig gevortext und anschließend 45 sec bei 20.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Oberphase wird abgenommen und in ein neues Gefäß überführt.

Anschließend wird die phenolische Phase erneut mit 100 µl TE-Puffer versehen, gevortext und zentrifugiert. Die obere Phase wird mit der bereits abgenommenen Oberphase vereint, während die phenolische Phase verworfen werden kann.

Die Präzipitation der DNA erfolgt durch Zusatz von 3 M Natrium-Acetat (NaAc, pH 5.7, 1/10 des Volumens) und absolutem Ethanol (2,5faches Volumen) über Nacht bei -20°C. Nach 90 Minuten Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C wird die sedimentierte DNA zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 20.000 x g, 4°C für 10 Minuten), wobei die jeweiligen Überstände verworfen werden. Die DNA wird bei 37°C im Inkubator getrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

2.1.5 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese können mit Hilfe von Agarosegelen in entsprechender Konzentration (0,5% bis 2,0%) DNA-Fragmente von 0,5-25kb Länge aufgetrennt und identifiziert werden. Standardmäßig wird 1g Agarose (Invitrogen®) in 100 ml TAE-Puffer, der Ethidiumbromid enthält, aufgekocht und nach dem Abkühlen in einen Gelträger gegossen. Nach dem Aushärten der Agarose kann das Gel verwendet werden. Die Elektrophorese erfolgt in TAE-Puffer, ebenfalls mit Ethidiumbromid versehen, bei 100-200V Spannung, wobei die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im Gel aufgetrennt werden. Das im Gel und im Laufpuffer vorhandene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8.0

DNA-Probenpuffer: 20% (w/v) Ficoll; 0.1% (w/v) Orange-G in TE-Puffer

TE-Puffer: 10 mM Tris, pH 7,5; 0,1 mM EDTA

2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD-Messung) mit Hilfe eines Photometers (Pharmacia, Ultraspec 3100 pro). Dabei errechnet sich die Nukleinsäurekonzentration aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA bzw. RNA spezifischem Multiplikationsfaktor (40 für RNA, 50 für doppelsträngige DNA). Die Konzentrationsmessungen erfolgen im Doppelansatz mit einer 1:50- oder 1:100-Verdünnung der Nukleinsäurelösung. Aus dem Verhältnis der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm kann außerdem die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Dieses Verhältnis beträgt bei proteinfreien Nukleinsäurelösungen 1,8 – 2,0.

2.2 Mikrobiologie

2.2.1 Lösungen und Medien

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml in 70% Ethanol

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Hefeextrakt; 0.58 g/l NaCl (10mM); 0.19 g/l KCl (2.5mM); MgCl₂ (10mM); 1.2 g/l MgSO₄ (10mM)

SOC-Medium: 3.6 g/l Glucose (20 mM) in SOB-Medium

2.2.2 Bakterienstämme

E. coli SURE: (Stop Unwanted Rearrangement Events) (Greener, 1990); recB, recJ, sbcC201, uvrC, umuC: Tn5(kanR), mcrA, mcrB, mrr lac, Δ (hsdRMS), endA1, gyrA96, thi, supE44 [F', proAB, lacIqZ Δ M15 FN10 (tetR)], Tetrazyklin-resistent

E. coli Wk6λ: λ-lysogen, temp-, Δ(lac-proAB) gal E, str A, [F' lac Iq, ZΔM15, pro A+B+]

2.2.3 Transformation von kompetenten Zellen mittels Elektroporation

Als Transformation wird die Aufnahme von DNA in ein Bakterium bezeichnet. Die Aufnahme wird mit Hilfe der Elektroporation erreicht, bei der durch das Anlegen einer hohen Spannung (mehrere 1000 V) kurzfristig ein elektrisches Feld erzeugt wird, das in der Bakterienmembran Löcher hervorruft, die sich sofort wieder schließen. Fremd-DNA kann durch die Öffnungen in die Bakterienzellen eingeführt werden. Die aufgenommene DNA wird dauerhaft integriert und kann aktiv vom Bakterium exprimiert werden.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem JETSTAR-System®

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wird das JETSTAR Plasmid Purification Kit® von der Firma GENOMED verwendet. Dieses Reinigungssystem ist eine modifizierte Methode der alkalischen/SDS-Methode, um klare Lysate zu erhalten. Die Lysate werden nach der Neutralisation auf eine JETSTAR-Säule (Mini, Midi oder Maxi) gegeben, wobei die Plasmid-DNA an der Anionenaustauschersäule gebunden wird. Durch Waschen der Säule werden RNA und andere Verunreinigungen beseitigt, und die DNA kann von der Säule eluiert und durch Alkoholpräzipitation konzentriert werden.

Zellsuspensionspuffer: 50 mM Tris; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 µg/ml RNase

Lysis-puffer: 200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)

Neutralisationslösung: 3,1 M Kaliumacetat; pH 5,5

Equilibrierungslösung: 600 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat; 0,15% TritonX-100; pH 5,0

Waschpuffer: 800 mM NaCl; 100 mM Natriumacetat; pH 5,0

Elutionspuffer: 1250 mM NaCl; 100 mM Tris; pH 8,5

Je nach gewünschter DNA-Ausbeute wird eine entsprechende Menge LB-Medium/Selektionsmarker (Mini: 2 ml, Midi: 20 ml, Maxi: 200 ml) mit den Bakterien angeimpft, die das zu reinigende Plasmid enthalten. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C auf

einem Kulturschüttler (180 rpm) inkubiert. Nach Zentrifugation der Kultur wird das Bakterienpellet in Zellsuspensionslösung resuspendiert (Mini: 0,4 ml, Midi: 4 ml, Maxi: 10 ml). Die Lyse der Bakterien erfolgt durch einen Lysispuffer (Mini: 0,4 ml, Midi: 4 ml, Maxi: 10 ml), der nach 5 Minuten Inkubation durch die Zugabe der Neutralisationslösung (Mini: 0,4 ml, Midi: 4 ml, Maxi: 10 ml) neutralisiert wird. Nach Zentrifugation (10 Minuten bei 12.000 x g) wird der Überstand, der die DNA enthält, auf die zuvor mit der Equilibrierungslösung (Mini: 2 ml, Midi: 10 ml, Maxi: 30 ml) behandelte Säule gegeben. Nachdem die Säule mit Waschpuffer gewaschen (Mini: 2 x 2,5 ml, Midi: 2 x 10 ml, Maxi: 1 x 60 ml) wurde, kann die DNA mit 50 °C warmer Elutionslösung (Mini: 0,9 ml, Midi: 5 ml, Maxi: 15 ml) eluiert werden. Die DNA wird dann mit dem 0,7fachen Volumen an Isopropanol präzipitiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C 30 Minuten zentrifugiert (12 000 x g). Das DNA-Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, 15 Minuten zentrifugiert, luftgetrocknet und in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen. Anschließend kann die Konzentration der DNA-Lösung mittels OD-Messung (2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren) bestimmt werden.

2.3 Allgemeine proteinchemische Methoden

2.3.1 Isolierung von Proteinen

Für die Isolation von Proteinen aus Zellen werden diese wie gewohnt mit TEP oder durch Abschaben vom Zellkulturgefäß geerntet. Die Zellen werden durch Zentrifugation (5 Minuten, 1000 rpm bei 4°C) pelletiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lyse der Zellen erfolgt mit einem Zelllysepuffer (20 mM Tris pH 7,5 / 150 mM NaCl / 2 mM EDTA / 1% (w/v) Nonidet P-40 / 50 mM NaF / 1 mM Na₄P₂O₇). 2,5 ml des Lysepuffers werden mit einer ¼ Protease-Inhibitortablette (Complete, Mini, Roche) und 2,5 µl 100 µM Okadaic Acid (K-salz, Calbiochem) versehen. Je nach Zellzahl werden die Zellpellets in einer entsprechenden Menge an Lysepuffer lysiert. Die Zelllysate werden 10 Minuten bei 20.800 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach der Bestimmung der Proteinmenge mittels des Bradford-Tests werden die Zelllysate mit 2x SDS-Probenpuffer, der 1% frisch zugesetztes Mercaptoethanol enthält, versehen und können nach 5 Minuten Denaturierung bei 95°C auf ein SDS-Gel zur Analyse aufgetragen werden. Dabei werden meist 10µg Protein / Tasche auf ein SDS-Gel gegeben.

2.3.2 Isolierung von Proteinen mit dem TRI-Reagent®

Um gleichzeitig Proteine und RNA aus Gewebeproben der Maus zu isolieren, bietet sich das TRI-Reagent® an, mit dem gleichzeitig RNA, DNA und Protein aus einer Probe gereinigt werden können. Dies ist vor allem von Vorteil, wenn nicht genügend Probenmaterial zur Verfügung steht. Die Isolation der RNA mit dem TRI-Reagent® wurde bereits in 2.1.1 ausführlich beschrieben und gilt bis zur Phasentrennung auch für die Proteinisolation. Die obere wässrige Phase enthält die RNA, in der Interphase befindet sich die genomische DNA und die untere, phenolhaltige Phase enthält die Proteine. Letztere wird nach Abnahme der wässrigen Phase für die RNA-Isolation weiter prozessiert.

Um die Proteine isolieren zu können, muss zunächst die genomische DNA präzipitiert werden. Dazu werden 0,3 ml 100% Ethanol pro ml TRI-Reagent® zu der Probe gegeben, über

Kopf gemischt und 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wird anschließend 5 Minuten bei 4°C und 2.000 x g sedimentiert. Der Überstand (Phenol/Ethanol-Phase) wird abgenommen und erneut zentrifugiert, um letzte DNA-Reste zu entfernen. Der Überstand wird in 0,2-0,5 ml-Portionen aliquotiert und mit dem 3fachen Volumen Aceton versehen. Nach kurzem Mischen und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proben 10 Minuten bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, um die ausgefallenen Proteine zu pelletieren. Das Proteinpellet wird 3 x mit einer 0,3M Guanidin-hydrochloridlösung (in 95% Ethanol mit 2,5% Glycerol v:v) gewaschen, wobei bei jedem Waschschrift vor der Zentrifugation 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wird. Die Zentrifugation erfolgt hierbei 5 Minuten bei 4°C und 8.000 g. Der letzte Waschschrift wird mit 1 ml Ethanol/2,5% Glycerol durchgeführt. Das Proteinpellet wird anschließend 7-10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einem Urea-Puffer (4,2 g Urea, 2,5 ml Upper Tris Puffer, 4 ml 1% SDS, 0,153 g DTT, 320 µl 250 mM EDTA auf 10 ml mit Wasser auffüllen) gelöst, wobei 0,2 ml pro 10-20 mg Gewebe eingesetzt werden. Um die Proteine für eine Western Blot-Analyse zu verwenden hat es sich als nützlich erwiesen, den Zellextrakt 3 Minuten bei 95°C zu erhitzen und anschließend durch Zentrifugation (5 Minuten, 10.000 g, RT) unlösliches Material abzutrennen.

2.3.3 BCA-Proteinbestimmung

Die Konzentration der isolierten Proteine wird mit dem Micro BCA-Protein Assay Reagent Kit von Pierce bestimmt. Das Prinzip (nach Smith, et al., 1985) basiert darauf, dass Proteine im alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^{+} reduzieren (Biuret-Reaktion). Die Bichinolin-4-carbonsäure (BCA) reagiert mit Cu^{+} , wobei zwei Bichinolinsäure-Moleküle einen Chelatkomplex mit dem Cu^{+} -Ion eingehen, der intensiv violett gefärbt ist.

Die Proteinproben werden in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte 1:5 mit Wasser verdünnt und mit 200 µl pro Loch Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A (enthält Natriumcarbonat, Natriumbikarbonat, Tartrat und 0,2 N Natriumhydroxid), 48 Teilen Lösung B (enthält BCA) und 2 Teilen Lösung C (enthält 4% Kupfersulfat-Pentahydrat) besteht, versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 540 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) mit bekannten Proteinkonzentrationen kann die unbekannte Proteinkonzentration mittels einer Eichgeraden und linearer Regression bestimmt werden.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

In einem Polyacrylamidgel werden Proteine nach Molekulargewicht und Ladung elektrophoretisch getrennt. Dabei wird die Eigenladung der Proteine durch den Zusatz von SDS (Sodiumdodecylsulfat) überlagert, sodass die Auftrennung nur noch der Größe nach erfolgt. SDS denaturiert die Proteine – besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol oder DTT – und es unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Im SDS-Gel wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei die Proteine durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Lämmli, 1970) werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt.

2. Material und Methoden

PAA:	30% (w/v) Polyacrylamid; 0.8% (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O (Rotiphorese Gel 30, <i>Roth</i>)
SDS (10%):	10% (w/v) Natriumdodecylsulfat
Laufpuffer (8fach):	1,85 M Tris; 0,67 M Glycin; 8% (v/v) SDS (10%); 16 mM EDTA; pH 8.8
APS:	40% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O
Lower Tris:	1,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 8.8
Upper Tris:	0,5 M Tris; 0,4% (w/v) SDS; pH 6.7
4xProbenpuffer (reduzierend):	2,581 ml UpperTris; 0,516 g SDS; 7 ml Glycerin (87%); 0,1788 g DTT, auf 10 ml Endvolumen mit H ₂ O auffüllen, mit Bromphenolblau versetzen
Trenngel (10%):	3,3 ml PAA; 2,5 ml Lower Tris; 4,1 ml H ₂ O; 8 µl TEMED; 12 µl APS
Trenngel (12.5%):	4,1 ml PAA; 2,5 ml Lower Tris; 3,2 ml H ₂ O; 8 µl TEMED; 12 µl APS
Sammelgel:	1,4 ml PAA; 2,0 ml Upper Tris; 4,2 ml H ₂ O; 10 µl TEMED; 16 µl APS
Längenstandard:	Page Ruler TM Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Nach dem Aufbau der Gelkassette (Geldicke: 1 mm) wird das Trenngel in die Kammer gegeben und mit Wasser überschichtet, so dass eine glatte Oberfläche entsteht. Das APS im Trenngel initiiert die Acrylamidpolymerisation, wobei TEMED ist der Katalysator für diese Reaktion ist. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Wasser entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, in welches ein Kamm eingesetzt wird. Ist auch das Sammelgel polymerisiert, kann das Abdichtgummi der Kammer entfernt werden. Die Gelkassette wird dann in die mit Laufpuffer (1-fach) gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt, der Kamm wird entfernt, und die Proben können aufgetragen werden. Die Proteinproben befinden sich in einer nicht denaturierenden Flüssigkeit (Puffer/H₂O) und werden deshalb mit 2x reduzierendem SDS-Probenpuffer, der 1% frisch zugesetztes Mercaptoethanol enthält, versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel 5 Minuten bei 95°C denaturiert und kurz zentrifugiert. Pro Tasche werden 10-20 µg Protein aufgetragen. Das Gel wird zunächst bei einer Spannung von 75 V, später von 150 V, laufen gelassen. Erreicht der Probenpuffer den unteren Rand des Gels, wird die Elektrophorese beendet und das Gel vorsichtig aus der Gel-Kassette entnommen. Die Proteine können mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert werden und anschließend mittels Ponceau S oder einer Immunmarkierung angefärbt werden.

2.3.5 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine von einem Gel der SDS-Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran (Millipore[®], 0,45 µm) übertragen, die anschließend immunmarkiert werden können.

Blotpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol
--------------------	---

Im Tankblotter (Hoefer/AP-Biotech) wird eine Stromstärke von 80 V angelegt, wobei der Pluspol auf der Seite der Membran, der Minuspol auf der Seite des Gels angeschlossen wird (Transfer vom Minus- zum Pluspol). Nach 180 Minuten wird der Transfer beendet und die Membran aus der Kammer entnommen. Die transferierten Proteine können jetzt immunmarkiert oder mit Ponceau S angefärbt werden.

2.3.5.1 Ponceau S-Färbung

Ponceau S-Färbelösung: 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure

Ponceau S ist ein Azofarbstoff, der Proteine auf einer Nitrozellulose- oder PVDF-Membran anfärbt. Die Färbung wird häufig verwendet, um zu kontrollieren, ob Protein nach dem Western Blot auf die Membran übertragen wurde und ob die Proteinverteilung der aufgetragenen Proben gleichmäßig und damit vergleichbar ist. Die Membran wird in die Ponceau S-Färbelösung gegeben, wobei nach kurzer Zeit (5-10 Minuten) die Proteine durch eine rote Färbung auf der Membran sichtbar werden. Die Färbung ist reversibel und kann durch Schwenken in Wasser rückgängig gemacht werden, sodass die Membran für eine Immunmarkierung weiter verwendet werden kann.

2.3.5.2 Immunmarkierung und Entwicklung

TBS: 0,08% (w/v) NaCl; 0,002% KCl; 5 mM Tris-HCl pH 7,4

TTBS: 0,1% (w/v) Tween20 in TBS

1. Antikörper: 1:1000 in Milch oder BSA verdünnt; meist aus dem Kaninchen oder der Maus

2. Antikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper; erkennt schwere und leichte Kette eines IgG-Antikörpers aus der Maus bzw. dem Kaninchen

Blockierungslösung: 10 ml 0,3% H-Milch zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran

Substratlösung: ECL™ Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biotech
ECL-plus™ Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biotech

Die PVDF-Membran (Millipore®) mit den transferierten Proteinen wird 1 Stunde bei RT unter langsamen Schwenken mit Blockierungslösung inkubiert. Dabei werden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper abgesättigt. Der 1. Antikörper in Blockpuffer oder in BSA wird über Nacht bei 4°C unter langsamen Schwenken auf die Membran gegeben. Anschließend wird die Membran dreimal 10 Minuten mit 0,1% TTBS gewaschen, bevor die Membran für 1 Stunde mit dem 2. Antikörper in Blockpuffer (1:10.000) unter langsamen Schwenken inkubiert wird. Die Membran wird daraufhin dreimal mit 0,1% TTBS gewaschen. Durch Zugabe der Substratlösung wird die durch das an den 2. Antikörper gekoppelte Enzym, z.B. Meerrettichperoxidase, katalysierte Reaktion gestartet. Es kommt durch Oxidation des Chemilumineszenz-Substrates zu einer länger anhaltenden Lichtemission, die auf einem Röntgenfilm erfasst werden kann.

2.4 Tierische Zellkultur

2.4.1 Lösungen und Medien

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): 13,63 g/l DMEM-Pulver; 3,67 g/l (44 mM) NaHCO₃; 2,6 g/l (10 mM) HEPES; pH 7,2

RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium): Gibco RPMI Pulvermischung für 10 l (# 51800-035); 100 ml/10 l 1M Hepes; 16,8g /10 l NaHCO₃, pH 6,9-7,1

Pen/Strep-Lösung (100fach): 6,6 g/l Ampicillin; 10 g/l Streptomycin

Glutamin-Lösung(100fach): 29,22 g/l (200 mM) Glutamin

PBS (phosphate buffered saline): 8 g/l (140 mM) NaCl; 0,2 g/l (27 mM) KCl; 1,15 g/l (7,2 mM) Na₂HPO₄ × H₂O; 0,2 g/l (14,7 mM) KH₂PO₄

Puromycin-Lösung: 2,5 mg/ml Puromycin

MEM-NEAA: Gibco, 100x (#11140)

MEM-Sodium Pyruvat: Gibco, 100x 100mM (#11360-039)

HEPES-Puffer: Biochrom AG, 1M (# L1613)

β-Mercaptoethanol: 55 mM in PBS

FCS(fötales Kälberserum): Das FCS wird vor dem Gebrauch für eine 45 Minuten bei 56°C inkubiert, um Komplementfaktoren zu deaktivieren.

DMEM₊₊: 88 % (v/v) DMEM; 1 % (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1 % (v/v) Glutamin-Lösung (100fach); 10 % (v/v) FCS

DMEM₊₊/ Puromycin: 5 µg/ml Puromycin-Lösung (2.5 mg/ml) in DMEM₊₊

DMEM₊₊/FCS-frei: 98 % (v/v) DMEM; 1% (v/v); Pen/Strep-Lösung (100fach); 1 % (v/v) Glutamin-Lösung (100fach)

RPMI₊₊: 88 % (v/v) RPMI; 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lösung (100fach); 10% (v/v) FCS

RPMI_{full} : 84 % (v/v) RPMI; 1% (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1% (v/v) Glutamin-Lösung (100fach); 1% (v/v) HEPES (1M); 1% (v/v) MEM-NEAA (100fach); 1% (v/v) β-Mercaptoethanol (55 mM); 1% (v/v) MEM-Sodium Pyruvat (100fach); 10% (v/v) FCS

OptiMEM: OPTI-MEM[®]I Reduced Serum Medium modification of MEM von Gibco

Die Lagerung der Medien erfolgt bei 4°C, die der Lösungen und des FCS bei -20°C. Die Medien werden autoklaviert, die Lösungen steril filtriert.

2.4.2 Zelllinien

C3H10T^{1/2}: diploide Fibroblasten-Zelllinie, aus einer C3H-Mausembryo-Zelllinie isoliert (Reznikoff, C.A. et al., 1973a,b), ATCC, Kat. Nr. CCL226

C3H10T^{1/2}_{NFκB luc}: C3H10T^{1/2}-Zelllinie, rekombinant ein NFκB Luziferase Reporterplasmid exprimierend; Puromycin-resistent

C3H10T^{1/2}_{LV-dnTAK}: C3H10T^{1/2}-Zelllinie, lentiviral integriertes dominant-negatives TAK1 exprimierend;

C3H10T^{1/2}_{LV-wtTAK}: C3H10T^{1/2}-Zelllinie, lentiviral integriertes wildtyp-TAK1 exprimierend

RAW 264.7: murine Makrophagen-Zelllinie, aus einem Tumor, der durch den murinen Abelson-Leukämie-Virus induziert wurde, isoliert (Raschke, et al., 1978), ATCC[®], Kat.Nr.: TIB-71TM

J774.1: murine Makrophagen-Zelllinie; aus Balb/c Maus isoliert (Cancer Res., 37, 547-550, 1977; J. Exp. Med., 143, 1528-1533, 1976. Nature, 257, 397-393, 1975)

2.4.3 Kulturbedingungen

Die Zellen werden in Kulturflaschen oder Petrischalen mit Wachstumsmedium bei 37°C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Alle 2 bis 3 Tage wird das Medium gewechselt.

C3H10T ^{1/2}	DMEM++
C3H10T ^{1/2} _{NFκB luc}	DMEM++/Puromycin
C3H10T ^{1/2} _{LV-dnTAK}	DMEM++/Doxycyclin
C3H10T ^{1/2} _{LV-wtTAK}	DMEM++/Doxycyclin
HEK-293T	DMEM++
J774.1	RPMI <i>full</i>
RAW	RPMI++

2.4.4 Passagieren von Zellen

Nach Waschen der Zellen mit warmem PBS werden diese mit TEP überschichtet und für wenige Minuten inkubiert. Durch leichtes Klopfen können die Zellen vom Boden gelöst werden. Die Zellsuspension wird zur Deaktivierung des Trypsins mit mindestens der doppelten Menge Medium versetzt und resuspendiert. Die Zellzahl der Suspension wird mit Hilfe einer Fuchs-

Rosenthal-Zählkammer (Faktor 5000) bestimmt. Nach Einstellung der gewünschten Zellzahl mit Medium wird die Zellsuspension auf neue Kulturgefäße verteilt.

2.4.5 Einfrieren von Zellen

Nachdem die Zellen in einer mittleren Flasche bis fast zur Konfluenz gewachsen sind, werden diese mit PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. In Greiner-Zentrifugenröhrchen werden die Zellen dann bei 800 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml FCS mit 5% DMSO resuspendiert. In Aliquots von 1,5 ml wird die Zellsuspension auf Kryo-Röhrchen verteilt und 24 Stunden bei -70°C eingefroren. Danach werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um das Anwachsen der Zellen und deren Vitalität nach dem Einfrieren zu testen, wird am Tag nach dem Einfrieren eine Taukontrolle durchgeführt.

2.4.6 Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen werden zunächst aus dem Stickstofftank geholt und für ~30 Minuten bei -70°C gelagert. Anschließend werden die tiefgefrorenen Zellen schnell durch Schwenken in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und sofort mit frisch angesetztem Medium in einer kleinen Flasche ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen (ca. 2 Stunden nach dem Auftauen) sollte zur Entfernung des DMSO bereits der erste Mediumwechsel erfolgen.

2.4.7 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA in Zellkulturzellen eingebracht. Dabei wird zwischen der transienten Transfektion, bei der das Plasmid nur zeitweise in die Wirtszelle eingebracht wird, und der stabilen Transfektion, die zum dauerhaften Einbau der DNA in das Genom der Wirtszelle führt, unterschieden. Durch Abbauprozesse wird fremde DNA normalerweise schnell abgebaut, nach dem Einbau in die Wirts-DNA wird dieser Vorgang jedoch unterbunden. Die Transfektion von eukaryotischen Zellen erlaubt die Untersuchung des eingebrachten Gens und dessen Effekt auf die transfizierte Zelle.

2.4.7.1 Stabile Transfektion mit DOSPER

Für die Transfektion wird das DOSPER Liposomal Transfection Reagent eingesetzt, welches auf der liposomalen Transfektion von Zellen basiert. Das DOSPER-Reagenz (chemische Bezeichnung: 1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid, $\text{C}_{58}\text{H}_{113}\text{O}_{13}\text{N}_5$) ist ein polykationisches Lipid, welches bei der Mischung mit der natürlicherweise negativ geladenen DNA spontan stabile Liposomen/Polynukleotid-Komplexe bildet, wobei die positiv geladenen Spermin-Kopfgruppen von DOSPER die negativ geladenen DNA-Moleküle binden. Diese Liposomen/Polynukleotid-Komplexe können direkt zum Zellkulturmedium gegeben werden. Sie binden an der Zelloberfläche, fusionieren mit der Zellmembran und setzen die negativ geladene DNA in das Cytoplasma der Zielzelle frei. Zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen mit dem Ziel einer stabilen Integration dieser DNA in das Wirtsgenom gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Transfektionssysteme. Bei der hier gewählten Methode der Co-Transfektion wird das Ziel-Gen mit einem Selektionsplasmid für eine Antibiotikaresistenz im Konzentrationsverhältnis 1:10 zusammen eingesetzt. Das Selektionsplasmid wird ebenfalls in das Wirtsgenom integriert und ermöglicht den Zellen, in Medium mit Antibiotikum zu

wachsen, während die nicht mit dem Selektionsplasmid transfizierten Zellen absterben, auch wenn sie das Ziel-Gen aufgenommen haben. Da die Möglichkeit besteht, dass das Selektionsplasmid auch ohne Ziel-Gen in die Zellen einbaut wird, müssen nach Transfektion und Selektion die sich bildenden Zellkolonien einzeln isoliert und anschließend genetisch untersucht werden.

Für die Transfektion von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurde das Selektionsplasmid pBSpACAp eingesetzt, das eine Puromycin-Resistenz verleiht, über die erfolgreich transfizierte Zellen selektiert und kultiviert werden können.

Die Aussaat der Zellen erfolgt einen Tag vor der Transfektion in einer 12-Lochplatte, wobei 30.000 Zellen pro Loch ausgesät werden. Die Zellen werden vor der Transfektion 2 Stunden in frisch angesetztem Medium mit 10% FCS inkubiert (2 ml/Loch), anschließend einmal mit je 2 ml FCS-freiem Medium gewaschen und dann mit genau 1 ml FCS-freiem Medium pro Loch versehen. Es wird ein Transfektionsansatz aus zu transfizierender DNA und Selektionsplasmid in 62,5 μ l HBS-Puffer mit einer Endkonzentration der zu transfizierenden DNA von 2,4 μ g/ml und einer Endkonzentration des Selektionsplasmids von 0,3 μ g/ml sowie eine DOSPER-Verdünnung in 62,5 μ l HBS mit der Endkonzentration 160 μ g DOSPER/ml hergestellt. Der Transfektionsansatz und die DOSPER-Verdünnung werden vorsichtig vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung des DOSPER/DNA-Komplexes zu ermöglichen. Von diesem Mix (125 μ l) werden 75 μ l pro Loch auf die Zellen gegeben und gemischt. Die Zellen werden dann für 6 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 1 ml DMEM /20 % FCS versetzt, sodass die Endkonzentration an FCS im Medium wieder 10 % beträgt. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgt der erste Mediumwechsel mit Selektionsmedium. Am zweiten Tag nach der Transfektion werden die Zellen trypsinisiert und auf der zweifachen Fläche mit Selektionsmedium ausgesät. Dafür werden die Zellen aus drei Löchern (insgesamt 10,9 cm² Fläche) der 12-Lochplatte, die mit derselben DNA transfiziert wurden, gepoolt und in einer kleinen Petrischale (Greiner, 19 cm²) ausgesät. Nicht transfizierte Zellen sterben dabei aufgrund des Selektionsmediums ab. Die durch das Spreiten in eine kleine Petrischale vereinzelter Zellen wachsen dann zu Klonen heran (1-2 Wochen), von denen acht möglichst weit auseinander liegende Klone gepickt und getrennt weiterkultiviert werden, um genetisch einheitliche Zelllinien zu erhalten. Um die Klone auf den Einbau des transfizierten Konstrukts und auf ihre Eignung für die späteren Versuche zu untersuchen, werden von jedem Klon zwei Erhaltungskulturen in kleinen Zellkulturflaschen für die RNA- und Proteinanalyse angelegt. Außerdem werden von jedem Klon Proben eingefroren (2.4.5, S.42).

2.4.7.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Nicht immer ist eine stabile Transfektion für die Analyse von Proteinen erforderlich. In solchen Fällen bietet sich eine transiente Transfektion an. Dabei können eine oder mehrere DNAs beziehungsweise siRNA ohne Selektionsdruck in die Zellen eingebracht und exprimiert werden. Die Zellen werden dabei so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Zelldichte von 90-95% aufweisen.

2.4.7.2.1 *Transiente Transfektion von DNA mit LipofektaminTM 2000*

Für die Transfektion in einer 24-Lochplatte wurden die Zellen eine Stunde vor Transfektion in 500 µl serumfreien Medium (OptiMEM®) pro Loch inkubiert. Für jedes Loch wurden 0,8 µg der zu transfizierenden DNA in OptiMEM® verdünnt. Von dem Lipofektamin wurden 3 µl pro Loch ebenfalls in 50 µl OptiMEM® verdünnt, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit der verdünnten DNA 1:1 gemischt (Endvolumen 100 µl). Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lipofektamin-DNA-Gemisch vorsichtig auf die Zellen getropft. Eine Transgenexpression konnte 24 Stunden nach der Transfektion nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen entweder für Stimulationsversuche weiterverwendet oder geerntet. Für die Zellernte wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden des Loches abgespült. Die Reaktion wurde durch Zusatz von serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 450 x g, 4°C, 5 Minuten pelletiert. Nach der gründlichen Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Erfolgte die transiente Transfektion in größeren Lochplatten oder Zellkulturschalen, so wurde sowohl die DNA als auch die eingesetzte Menge an Lipofektamin entsprechend der Kultivierungsfläche angepasst.

2.4.7.2.2 *Transiente Transfektion von siRNA mit LipofektaminTM*

Für die transiente Transfektion von siRNA in die Makrophagenzelllinie J774.1 wurden die Zellen ein paar Stunden vor der Transfektion in einer 24-Lochplatte mit 250.000 c/well ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen sind (ca. 3 Stunden) wird die Transfektion durchgeführt. Dazu werden sowohl die Ziel-siRNA als auch eine Kontroll-siRNA (siCTR) auf eine Konzentration von 20 µM verdünnt. Für jedes Loch werden sowohl die siRNA (2 µl/Loch, entspricht einer Endkonzentration von 100 nM pro Loch) als auch das Lipofektamin® (1,6 µl/Loch) mit jeweils 50 µl OptiMEM® verdünnt. Die beiden Mixe werden 1:1 gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft (100 µl). Die Zellen werden vor der Transfektion einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl OptiMEM®/well versehen. 24 Stunden nach der Transfektion können die Zellen für weitere Versuche verwendet oder geerntet werden.

Auch hier wurde die Menge an Lipofektamin und siRNA bei Verwendung größerer Lochplatten entsprechend der Kultivierungsfläche angepasst.

2.4.8 Stimulation mit Zytokinen

Um inflammatorische Signalwege und den Einfluss eingebrachter Gene bzw. der Inhibition bestimmter Proteine zu untersuchen, werden diese mit den inflammatorischen Zytokinen Interleukin-1β (IL-1β) bzw. Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) oder Lipopolysaccharid (LPS) für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Dafür werden die Zellen zunächst mit serumfreien Medium gewaschen und anschließend für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation beginnt durch den Zusatz des Zytokins (20 ng/ml) bzw. LPS (1 µg/ml) und wird nach entsprechender Zeit durch Absaugen des Mediums und den Zusatz von PBS gestoppt. Die Zellen werden dann entweder mit TriReagent® für die RNA-/cDNA-Analyse (2.1.1, S.30)

oder mit Lysepuffer für eine Proteinanalyse (2.3.1, S.36) mittels Western Blot (2.3.5, S.38) geerntet.

2.4.9 NFκB-Reportertest

Um die zytokinabhängige Aktivierung von NFκB zu untersuchen, wurde ein NFκB – Reporterkonstrukt stabil in C3H10T^{1/2} -Zellen zusammen mit einer Puromyzin-Resistenz eingebracht (2.4.7.1, S.42). In dem Reporter ist der Promotor von NFκB vor das Luziferase-Gen kloniert worden, so dass bei Aktivierung von NFκB das Luziferase-Gen abgelesen wird. Die Zellen werden nach Aussaat in einer 24-Lochplatte 1 Stunde mit serumfreien Medium inkubiert und anschließend mit verschiedenen Zytokinen (TNF-α oder IL-1β) oder LPS für verschiedene Zeitpunkte stimuliert (2.4.8, S.44). Nach einmaligem Waschen mit PBS, wodurch auch die Stimulation gestoppt wird, werden die Platten für mindestens 30 Minuten bei -70°C gelagert. Zur Aufarbeitung der Zellextrakte für den Reporterassay werden die Zellen mit 50 µl Lysepuffer pro Loch (0,5 ml cat-Lysepuffer 5x, 2ml H₂O, ¼ Protease-Inhibitor-Tablette (Complete, Mini, Roche)) durch Abschaben vom Boden der Lochplatte geerntet. Die Lysate werden 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und von den Überständen jeweils 7,5 µl in eine weiße 96 Lochplatte für den Luziferase-Test überführt. Im Abstand von ~1 Sekunde werden 25 µl Substrat (Luziferase) pro Loch zu den Proben pipettiert und mit einem Lumiometer (EG&G Berthold, Programm: Win Glow) gemessen.

2.4.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder das als Akronym verwendete Wort FACS (= ‚fluorescence activated cell sorting‘) ist eine Technologie, bei der einzelne Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom eine Anregungsquelle passieren, gezählt und analysiert werden können. Generell können dabei zwei Anwendungsbereiche unterschieden werden: die quantitative Analyse und das Sortieren von Zellen. Das Prinzip basiert auf der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, die an spezifische Antikörper gekoppelt sind und so eine chemische, physikalische und molekulare Analyse bestimmter Eigenschaften (quantitative Analyse) bzw. das Sortieren der zu untersuchenden Zellen ermöglichen. Fluoreszenz-markierte Zellen einer Einzelzellsuspension werden durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und in ungefähr gleicher Ausrichtung mittels einer dünnen Kapillare an einem Laserstrahl mit geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Ein Teil des Lichts wird von den Zellen gestreut und mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen. Dabei können durch die Messung des Vorwärtstreulichtes (FSC = *Forward Scatter*) im flachen Winkel Rückschlüsse auf das Zellvolumen gezogen werden. Das Seitwärtstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*) wird im rechten Winkel gemessen und korreliert mit der Komplexität (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zelle.

2.4.10.1 Fluoreszenzaktivierte Sortierung von Zellen

Um bestimmte Zellen aus einer Zellsuspension zu isolieren, werden die Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert, die zelltypspezifisch exprimierte Oberflächenmerkmale von Zellen, meist CD (*Cluster of Differentiation*)-Moleküle, erkennen. So markierte Zellen können aufgrund ihrer spezifischen Streueigenschaften und Fluoreszenzmarkierungen in zwei oder mehr Fraktionen sortiert werden (Abbildung 2-1, S.46). Dazu wird die sogenannte „Dot-Plot“-Darstellung, eine zweidimensionale Darstellung zweier Parameter, verwendet. Jede Zelle wird entsprechend ihrer Werte für Parameter 1 (X-Achse) und

Parameter 2 (Y-Achse) zwischen X- und Y-Achse als Punkt eingetragen. Auf diesem sogenannten „Dot-Plot“ lassen sich Flächen (Gates) für die Sortierung markieren. Die betreffenden Zellen werden dann von der Elektronik abgelenkt. Nach der Messung wird der Flüssigkeitsstrom durch Vibration in kleine Tropfen getrennt. Dabei werden die Zellen in einzelne Tröpfchen verpackt. Soll eine Zelle isoliert werden, wird das Tröpfchen kurz vor dem Abreißen vom Strahl mit einer elektrischen Ladung versehen. Es durchfliegt ein elektrostatisches Feld, das von zwei geladenen Metallplatten erzeugt wird, und wird in Richtung des Auffangröhrchens abgelenkt.

FACS Sortierung

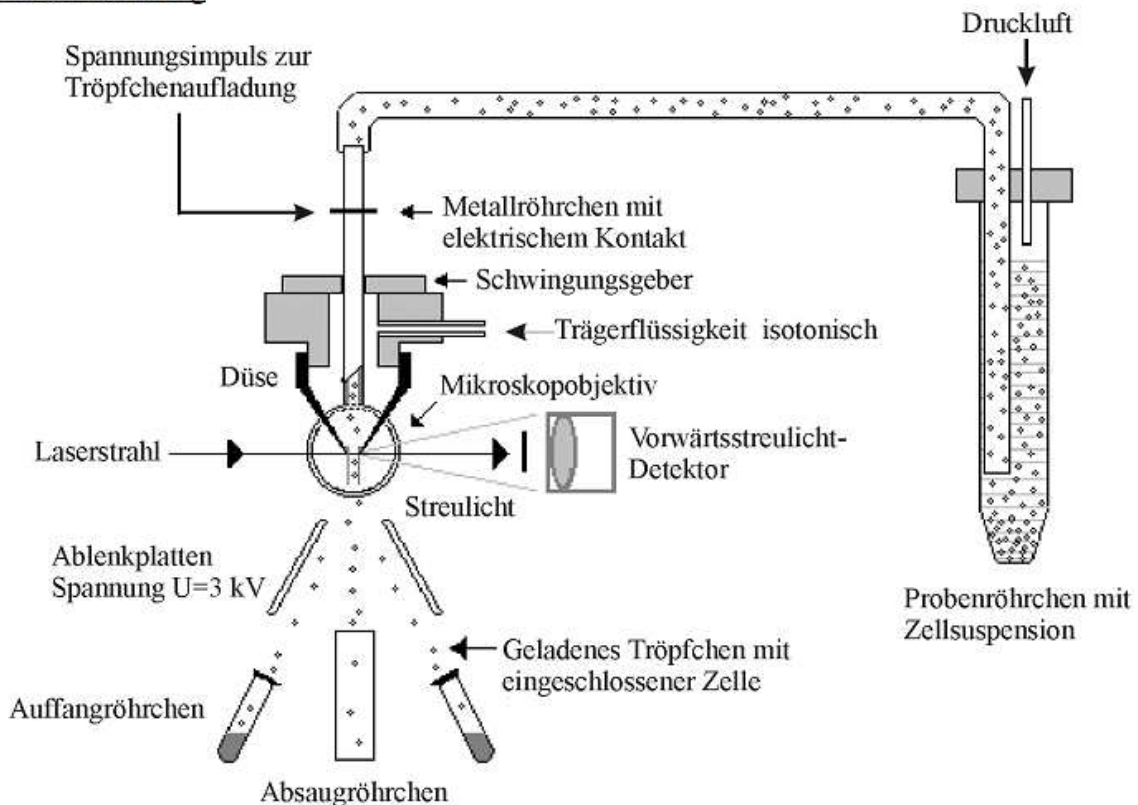


Abbildung 2-1 | Schematische Darstellung der Apparatur für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS). Die zum Teil mit fluoreszierenden Antikörpern markierte Zellsuspension wird mit Druckluft durch eine Düse gepresst, gleichzeitig wird eine Trägerflüssigkeit zugeführt. Unterhalb der Düsenöffnung trifft der Flüssigkeitsstrahl auf einen fokussierten Laserstrahl. Die den Laserstrahl passierenden Zellen streuen das Laserlicht, die markierten Zellen emittieren zusätzlich Fluoreszenzlicht. In Richtung des Laserstrahls wird das Vorwärtsstreulicht gemessen, im rechten Winkel das Seitwärtsstreulicht und die Floreszenzen. Am Abrisspunkt bricht der Flüssigkeitsstrahl in Tröpfchen auf, die während des Abreißens mit elektrischer Ladung versehen werden, indem kurzfristig der gesamte Flüssigkeitsstrahl aufgeladen wird. Geladene Tröpfchen mit den gewünschten Zellen werden beim Durchfliegen des elektrischen Feldes zwischen den geladenen Ablenkplatten in die jeweiligen Auffangröhrchen abgelenkt.

2.4.10.1.1 Probenvorbereitung

Für die Sortierung einzelner Zelltypen aus der Milz und den Lymphknoten (CD4^+ , CD8^+ , CD11b^+) werden zunächst Zellsuspensionen hergestellt. Dazu werden die Organe mit dem Stempel einer Spritze zerkleinert und über einen BD-Filter (cell-strainer, $100\text{ }\mu\text{m}$) filtriert. Die Zellsuspension wird gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und mit entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und mit dem FACS-Aria sortiert.

Monoklonale Antikörper (BD)

- CD8-PE/-FITC 1:200
- CD4-APC/-FITC 1:200
- CD3-APC-Cy7/-FITC 1:100
- CD11b-PE-Cy5 1:400

2.4.10.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurde das „Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Kit“ (#554714) von Becton Dickinson verwendet.

Stimulation

Nach der Isolation der Zellen aus der Milz wurde die Zellzahl auf 1×10^6 c/ml eingestellt und jeweils 1 ml/well in eine 24-Lochplatte pipettiert. Die Zellstimulation erfolgte mit 750 ng/ml Ionomycin und 20 ng/ml PMA. Die pH-Wert-Einstellung (Ziel: 7,0-7,4) erfolgte durch die Zugabe von 10 µl/ml Hepes-Puffer. Die Zellen wurden 6 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 2 Stunden wurden 10 µg Brefeldin-A pro Loch zugegeben. Damit wurde der Transport der Zytokine aus der Zelle verhindert.

Blockierung der Fc-Rezeptoren

Um eine nicht-spezifische Immunfluoreszenzfärbung zu reduzieren wurden die Fc-Rezeptoren blockiert. Dazu wurden die Zellen zunächst pelletiert, in Färbepuffer resuspendiert und gezählt. Die Blockierung erfolgte mit 1 µg BD-Fc-Block Reagenz pro 1×10^6 Zellen in 100 µl Färbepuffer für 15 Minuten bei 4°C. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und mit den Zelloberflächen-Antigenen gefärbt.

Färbung der Zelloberflächen-Antigene

Zu den vorpipettierten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene (hier: CD4 und CD8; verdünnt in 50 µl Färbepuffer pro 1×10^6 Zellen) wurden pro Röhrchen 100 µl der Zellsuspension gegeben und die Zellen bei 4°C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 250 µl Färbepuffer gewaschen und durch Zentrifugation (250 x g) pelletiert.

Fixierung und Permeabilisierung

Die Zellen wurden in 100 µl Fixierungs-/Permeabilisierungslösung pro Loch einer Mikrotiterplatte resuspendiert und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen einmal mit BD-Perm/WashTM Puffer (250 µl/Loch einer Mikrotiterplatte) gewaschen und pelletiert.

Färbung der intrazellulären Zytokine

Die Zellen wurden in 50 µl BD-Perm/WashTM Puffer aufgenommen, der den entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Anti-Zytokin-Antikörper enthält und 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1x BD-Perm/WashTM Puffer (250 µl/Loch)

gewaschen, in Färbepuffer aufgenommen und mittels einem Durchflusszytometer (FACS-Calibur) analysiert.

Reagenzien:

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (**PMA**), Sigma

Ionomycin, Calcium Salt, Streptomyces conglobatus, MW 747.1, Calbiochem

Färbepuffer: PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} ; 1% hitze-inaktiviertes FCS; 0,09 % (w/v) Natriumazid, pH 7,4-7,6; sterilfiltriert; Lagerung bei 4°C

Zytokin-Antikörper (BD):

IFN γ :	PacBlue	1:80
TNF α :	PE	1:80
IL-10:	Ax700	1:80

2.5 Lentiviren

Die Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren, wobei der bekannteste Vertreter wohl das humane Immundefizienz-Virus Typ1 (HIV-1) ist, das die schwere Immunschwächekrankheit AIDS auslöst. Die Retroviren sind Viren, deren Genom aus zwei Kopien einzelsträngiger RNA besteht, das bei ihrer Vermehrung im Wirt in doppelsträngige DNA umgeschrieben wird – entgegen dem Zentralen Dogma der Molekulargenetik (Coffin, 1996). Dieser Vorgang wird durch ein spezielles Enzym, die reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) katalysiert. Das Genom des Virus, das dann als dsDNA vorliegt, wird durch ein spezielles Virusenzym, die Integrase, in das Wirtsgenom integriert. Die Virusgene werden zusammen mit denen des Wirts abgelesen und mit Hilfe der Maschinerie der Wirtszelle transkribiert und translatiert. Die entstehenden Virusproteine werden zur Zellmembran transportiert und zu infektiösen Viruspartikeln zusammengebaut, die dann durch Knospung von der Wirtszelle freigesetzt werden (Schweizer, et al., 2001). Lentiviren können sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen infizieren, was sie für den Gentransfer in Zellen und für gentherapeutische Zwecke besonders interessant macht (Lewis, et al., 1994; Bukrinsky, et al., 1993).

2.5.1 Retroviraler Gentransfer

Retroviren werden für den Transfer von Fremdgenen in Zielzellen eingesetzt. Das retrovirale Genom besteht aus drei Genbereichen: *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), wobei *gag* den Proteinmantel, *pol* die viralen Enzyme und *env* das Hüllprotein kodiert. Weitere wichtige Elemente des retroviralen Genoms sind die als LTRs (*long terminal repeats*) bezeichneten Nukleinsäurebereiche, die das Überschreiben (Transkription) des retroviralen Genoms regulieren, und ein Verpackungssignal ψ , das dafür sorgt, dass das retrovirale Genom in einen Proteinmantel eingehüllt wird. Um retrovirale Vektoren herzustellen, wird das Genom der Retroviren zunächst in drei Teile zerlegt: Zwei davon sind Verpackungskonstrukte, die die retroviralen Proteine *gag*, *pol* und *env* kodieren, wobei *gag/pol* von einem Plasmid und *env* von einem anderen Plasmid kodiert werden. Der dritte Teil ist das Transferkonstrukt, das aus den das Konstrukt flankierenden LTRs, dem Verpackungssignal und dem zu transferierenden Fremdgen besteht. Alle drei Teile des retroviralen Genoms werden über

eine transiente Dreifach-Cotransfektion in eine Zelllinie übertragen. Die Verpackungskonstrukte produzieren alle viralen Proteine, wobei die Gene selber aber nicht in einen Proteinmantel eingebaut werden können, da in diesen Konstrukten ein Verpackungssignal fehlt. Dagegen wird das ein Verpackungssignal besitzende Transferkonstrukt in einen Proteinmantel verpackt und mit dem Hüllprotein versehen. Die so entstehenden Vektorpartikel werden von der Verpackungszelllinie in den Zellkulturüberstand sekretiert und können geerntet und gereinigt werden. Bei der Infektion von Zielzellen mit den Vektorpartikeln wird das RNA-Genom des Vektors übertragen, welches nur das Fremdgen, aber keine viralen Gene enthält. Die Vektor-RNA wird in das Genom der Zielzelle integriert, und das Fremdgen kann dann exprimiert werden (Luciw, 1996 ; Miller, 1997; Schweizer, et al., 2001; Palu, et al., 2000; Vigna, et al., 2000). Die Herstellung von retroviralen Vektoren mit Hilfe einer Verpackungszelle ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

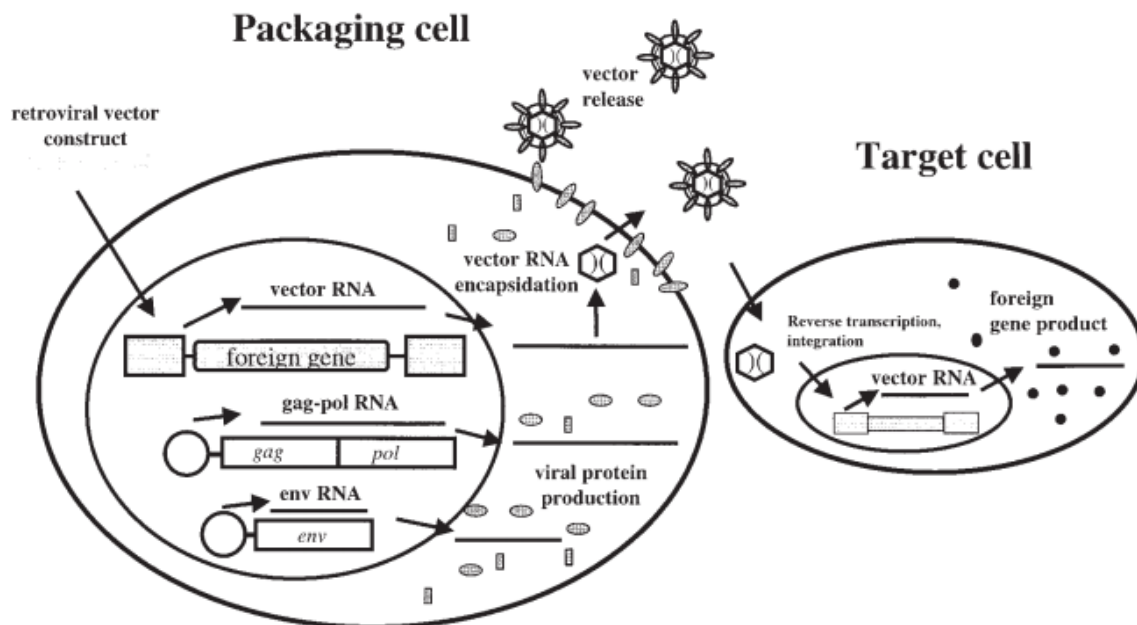


Abbildung 2-2 | Herstellung rekombinanter Retroviren (retrovirale Vektoren) mit Hilfe von Verpackungszellen. Virale Gene mit nicht-retroviralen Promotoren werden stabil in die eine Verpackungszelllinie integriert und zusammen mit den Genen des Wirts abgelesen. Mit Hilfe der Maschinerie der Wirtszelle zur Transkription und Translation werden virale Strukturproteine und Enzyme hergestellt. Wird gleichzeitig ein retroviraler Vektor mit dem Zielgen in die Zelle transfiziert, kann die Vektor-RNA zusammen mit den Virusproteinen an der Zellmembran zu infektiösen Viruspartikeln zusammengebaut werden. Diese werden dann in das Kulturmedium sezerniert und können für die Infektion von Zellen genutzt werden, wobei das Zielgen dann in den infizierten Zellen produziert wird (Schweizer, et al., 2001).

2.5.2 Regulation der Transgenexpression: Das Tet-System

Das Tet-Expressions-System (Gossen, et al., 1992) ermöglicht, die Expression eines Transgens genau zu kontrollieren, indem diese gezielt an- und ausgeschaltet werden kann. Dabei werden prokaryotische Regulationseinheiten aus *E. coli* zur regulierten Genexpression in eukaryotischen Zellen eingesetzt. Der Promotor basiert auf regulatorischen Elementen des Tn-10-spezifischen Tetrazyklin-Resistenz-Operons (tetO) von *E. coli*, die mit einem minimalen eukaryotischen Promotor, dem *immediate early* Cytomegalovirus (CMV)-Promotor, ligiert wurden. Zur Transkription ist die Bindung eines koexprimierten chimären Transaktivators (rTA) erforderlich, der aus der Tetracyclin-Repressor-Domäne (tetR) von *E. coli* zur Anbin-

dung an den Promotor und der viralen Transkriptionsaktivator-Domäne VP16 des Herpes Simplex Viruses zur Aktivierung der Expression besteht (Chernajovsky, et al., 2004; Toniatti, et al., 2004).

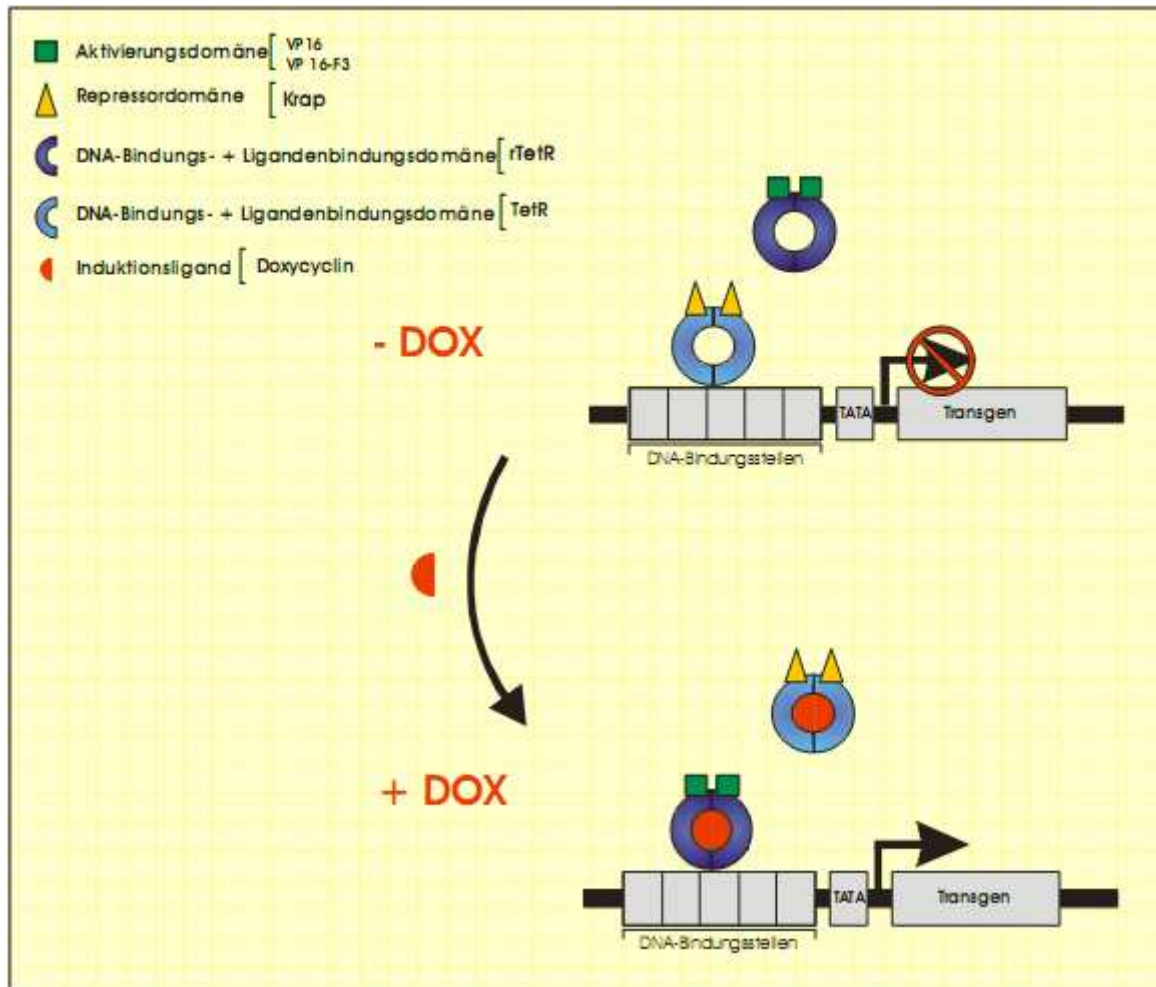


Abbildung 2-3 | *rtTA/tTS basiertes Tet-On System*. tTS besteht aus TetR, das mit einer KRAB Repressordomäne fusioniert wurde. In der Abwesenheit von Dox bindet und reprimiert tTS den Zielpromotor. Bei Zusatz von Dox wird tTS von der DNA freigesetzt, während rTA an die DNA binden und den Promotor aktivieren kann, so dass eine Expression des Transgens erfolgt (Quelle verändert nach Toniatti, et al., 2004).

In der Originalversion dieses Systems wird durch die Zugabe von Tetrazyklin (tet) die Bindung des rTA an den Promotor und so die transkriptionelle Aktivierung reprimiert. Das System wird als tet-off bezeichnet. In einer anderen Variante, dem tet-on System, das auf einer mutierten tetR-Sequenz basiert, wird der Transaktivator durch die Zugabe von tet aktiviert und erlangt die Fähigkeit, an den Promotor zu binden und die Transkription zu starten. Da dieses Transaktivatormolekül revers zum originalen rTA agiert, wird es als reverser Transaktivator (rtTA) bezeichnet (Chernajovsky, et al., 2004; Toniatti, et al., 2004). Anstelle des Tetrazyklins kann auch sein wirksames Homolog Doxzyklin (Dox) verwendet werden. Dieses bindet mit einer höheren Affinität als Tetrazyklin sowohl an tTA als auch an rtTA und kann in geringeren Konzentrationen eingesetzt werden.

In einer in diesen Versuchen verwendeten, erweiterten Variante des Tet-on Systems wird eine noch stringendere Kontrolle der Expression des eingebrachten Transgens durch einen Dox-abhängigen Silencer (rTS) erreicht. rTS besteht aus einer KRAB (Krüppel-Associated Box)-

Repressordomäne, die mit dem wt TetR fusioniert ist. Wird rTS mit rtTA coexprimiert, so bindet rTS in Abwesenheit von Dox an TetO, wodurch die basale Transkription des Transgens verhindert wird. Wird jedoch Dox zugegeben, so bindet dieses sowohl an rTS als auch an rtTA. Beide werden durch die Bindung von Dox allosterisch verändert, wobei rTS von der TetO-Bindungsstelle abgelöst wird, während rtTA an diese bindet und die Transkription des Transgens aktiviert wird.

2.5.3 Lösungen und Medien

Doxyzyklin:	1 mg/ml in dest. H ₂ O; sterilfiltriert (Calbiochem)
2x HBS:	0,28 M NaCl; 0,05 M HEPES-Säure; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,05; steril filtriert
Polybrene:	8 mg/ml in dest. H ₂ O, steril filtriert (Sigma)
HEPES:	1 M (238,3 g/L), steril filtriert
CaCl₂:	2,5 M, steril filtriert
DMEM₊₊	88 % (v/v) DMEM; 1 % (v/v) Pen/Strep-Lösung (100fach); 1 % (v/v) Glutamin-Lösung (100fach); 10 % (v/v) FCS
DMEM₊₊/Polybrene:	8 µg/ml Polybrene (8 mg/ml) in DMEM ₊₊
DMEM₊₊/Dox:	1 µg/ml Doxycyclin (1 mg/ml) in DMEM ₊₊

2.5.4 Herstellung von Lentiviren

Die Herstellung der Lentiviren erfolgt über die Calciumphosphat (CaPO₄)-Transfektion von HEK-293T Zellen. Es werden 1×10^7 HEK-293T Zellen in einer TC-Schale (142 cm²) gleichmäßig in 30 ml Medium (DMEM 10% ++) ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die CaPO₄ Transfektion erfolgt am Vormittag des nächsten Tages. Zu einem DNA Gemisch aus den beiden Helferplasmiden pCMVΔR 8.2 (50 µg/Transfektion) und pMD-GVSVG (12,5 µg/Transfektion) und dem Zielpiasmid (50 µg/ Transfektion) werden 280 µl CaCl₂ (2,5 M) gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1.400 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieses Gemisch wird langsam zu 1.400 µl HBS-Puffer getropft, 3-5 Sekunden gevortext und 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dabei bildet sich ein feines Präzipitat aus Calciumphosphat und DNA, welches dann auf die Zellen gegeben wird, die die Kristalle dann über Endozytose aufnehmen. Die Zellen werden 15-20 Minuten unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 20 ml Medium zu jeder Schale gegeben. Nach 24 Stunden wird das alte Medium abgenommen und 15 ml neues Medium, das 10 mM HEPES-Puffer enthält, auf die Zellen gegeben. Die erste Virusernte erfolgt 48 Stunden nach der Transfektion. Dazu werden die 15 ml Medium von den Zellen abgenommen und mit einer 0,45 µm Filtriereinheit (Sartorius) filtriert, wodurch Zellrückstände abgetrennt werden. Die Viruslösung wird über Nacht bei 4°C gelagert und die Zellen mit 15 ml frischem, HEPES-haltigem Medium versorgt. Am nächsten Tag erfolgt die zweite Virusernte (72 Stunden nach der Transfektion), wobei erneut das Medium von den Zellen abgenommen und filtriert wird. Die TC-Schale mit

den Zellen wird entsorgt. Die geernteten Viruslösungen werden 1:1 gemischt und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.5 Titerbestimmung

Für die Titerbestimmung werden 10 µl des Virusüberstandes mit 50 µl Trizol gemischt. Die RNA wird wie in 2.1.1 beschrieben isoliert, wobei die Volumina entsprechend angepasst werden. Das RNA-Pellet wird in 11,6 µl 0,1% igem DEPC-Wasser aufgenommen und 10 Minuten bei 58°C inkubiert. Anschließend erfolgt die cDNA-Synthese (2.1.2, S.30), wobei statt des Oligo dT₁₂₋₁₈ – Primers ein vektorspezifischer Primer (Vektor = pLOX, Primer = pLOX reverse Primer) eingesetzt wird. Es wird eine RT-PCR durchgeführt, wobei als Template-DNA verschiedene cDNA-Verdünnungen (pur, 1:10 bis 1:10⁻⁵) und Verdünnungen des eingebrachten Vektorkonstruktes mit dem „gene of interest“ (1 pg bis 10 ng) eingesetzt werden. Durch den Vergleich der Bandenintensitäten von den c-DNA-Verdünnungen mit denen der Vektorverdünnungen kann die Menge an Vektor-DNA, die sich in der aus dem Virusüberstand gereinigten cDNA befindet, abgeschätzt werden. Mit Hilfe der Avogadro-Konstante (6,023 x 10²³) kann dann die Anzahl der Viruspartikel, die sich in dem Virusüberstand befinden, ausgerechnet werden. Es ist wichtig, die Anzahl der infektiösen Partikel pro Milliliter zu kennen, um bei der späteren Infektion von Zellen eine bestimmte Anzahl von infektiösen Partikeln pro Zielzelle (MOI – multiplicity of infection) einsetzen zu können.

2.5.6 Infektion von C3H10T^{1/2} – Zellen

C3H10T^{1/2}-Zellen werden einen Tag nach der Aussaat mit Lentiviren infiziert. Dabei erfolgt eine Co-Infektion mit dem MIK-Lentivirus (1:10 Verdünnung) und dem Lentivirus, der das Transgen enthält (1:5 Verdünnung). Durch den **MIK-LV** [rtTA2S-**M2** (Transaktivator), **IRES** (internal ribosomal entry site) und **KRAB** (Repressor)] wird eine Regulation der Transgenexpression über das in 2.5.2 beschriebene Tet-On System ermöglicht. Für die Infektion werden die Viren zunächst in einer entsprechenden Menge DMEM⁺⁺-Medium, das 8 µg/ml Polybrene enthält, verdünnt. Das Polybrene (1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene) ist ein positiv geladenes Polymer, welches an die Oberfläche von Zellen bindet und deren Ladung neutralisiert. Dadurch können die viralen Glykoproteine leichter an entsprechende Rezeptoren der Zelloberfläche binden, und die Effizienz der retroviralen Infektion wird erheblich gesteigert (in manchen Zellen um das 100 - 1000fache). Das Medium mit den Viren wird dann auf die Zellen gegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und dann im Brutschrank inkubiert. In manchen Fällen ist eine zweite Infektion nötig um eine gute Transgenexpression zu gewährleisten. Diese wird am Tag nach der ersten Infektion mit den gleichen Virusverdünnungen durchgeführt. 4-5 Stunden nach der 2. Infektion (bzw. bei einer Einfachinfektion 24 Stunden später) erfolgt ein Medienwechsel mit DMEM⁺⁺/Dox. 24-48 Stunden nach Dox-Gabe kann eine Transgenexpression nachgewiesen werden. Diese kann entweder visuell verfolgt werden, wenn es sich um ein fluoreszierendes Protein handelt oder die Expression wird mit Hilfe von Western Blot-Analysen (2.3.5, S.38) nachgewiesen.

Lentiviren werden stabil ins Genom der Zielzellen integriert, so dass mittels Subklonierung eine Zelllinie mit stabiler Transgenexpression erzeugt werden kann.

2.6 Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)

Als Mausmodell für die rheumatoide Arthritis wurde das Kollagen-induzierte Arthritismodell verwendet (1.3, S.17), da es das am häufigsten verwendete Modell zur Untersuchung der Pathogenese der RA sowie zur Identifikation und zum Test neuer therapeutischer Ziele ist. Obgleich es einige, genetisch geeignete Mausstämmen für die Induktion der CIA gibt (Tabelle 2-1, S.53), werden am häufigsten DBA/1- und B10.Q (H-2^q Stämme)- bzw. B10.RIII (H-2^r)- Mäuse verwendet. Im Verlauf dieser Studie wurden männliche DBA/1 Mäuse verwendet. Diese haben den Haplotyp H-2^q, der mit einer erhöhten Anfälligkeit für Arthritis in Verbindung steht (Brunsberg, et al., 1994). Die Mäuse wurden von Harlan, Gannat (Frankreich) bezogen und hatten zum Zeitpunkt der Immunisierung ein Alter von 8-9 Wochen. Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß den gesetzlichen Richtlinien. Die Mäuse erhielten Futter und Wasser ad libitum.

Tabelle 2-1 | Prädisposition verschiedener Mausstämmen für CIA

Quelle verändert nach Brand, et al., 2007

Stamm	Klasse II Haplotyp	Arthritis Inzidenz (%)	Beginn der Arthritis
DBA/1	I-A ^q	80-100	Tage 21-28
B10.M-DR1	DRB1*0101	80-100	Tage 21-28
B10.M-DR4	DRB1*0401	50-80	Tage 21-28
B10.RIII	I-A ^r	80-100	Tage 21-28
B10.Q	I-A ^q	80-100	Tage 21-28
DBA-TCR Tg	I-A ^q	80-100	Tage 21-28
C57BL/6	I-A ^b	Variabel	Variabel

2.6.1 Immunisierung mit bovinem Kollagen II

Zur Induktion der Arthritis werden die DBA/1-Mäuse mit heterologem Kollagen II aus dem Rind (bCII) immunisiert. Das Kollagen (Ref. IMBII-lyo (MD-Bioscience)) wird in 0,05 M Essigsäure gelöst mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Kollagenlösung wird mit dem gleichen Volumen an komplettem Freud'schem Adjuvanz (CFA) zu einer Emulsion verbunden, die eine weiße Färbung und eine zähflüssige Konsistenz hat. Dabei sollte die Emulsion bis zur Injektion stets kühl gehalten werden. Die komplette Freud'sche Adjuvanz enthält Hitze-inaktivierte Mykobakterien, die für die Stimulation der Entzündungsantwort, welche dann eine Immunantwort gegen CII initiiert, notwendig sind (Brand, et al., 2007).

Für die Injektionen werden die Mäuse leicht mit Isofluran anästhesiert. Die Immunisierung erfolgt durch subkutane Injektion von je 50 µl (50 µg) der bCII-Emulsion, rechts und links über der Schwanzbasis.

21 Tage nach der ersten Immunisierung wird eine zweite Immunisierung („Boost“) vorgenommen, wobei das bCII mit inkomplettem Freud'schem Adjuvanz (IFA) zu einer Emulsion vermischt wird und ebenfalls 100 µg pro Maus subkutan injiziert werden. Dies soll eine möglichst hohe Inzidenz der Arthritis gewährleisten.

Klinische Anzeichen für eine Arthritis (Schwellung und Rötung der Pfoten) können üblicherweise 2 bis 3 Wochen nach der ersten Immunisierung festgestellt werden. Zu diesem Zeit-

punkt werden die Mäuse in Gruppen für die nachfolgenden Versuche eingeteilt, sodass die Versuchsgruppen untereinander weitestgehend homogen, d.h. vergleichbar sind, was die Ausprägung der Arthritis betrifft. Um alle Tiere individuell beurteilen und den Verlauf der Arthritis dokumentieren zu können, werden die Tiere durch eine farbliche Markierung am Schwanz gekennzeichnet.

2.6.2 Beurteilung der Arthritis bei Mäusen

Die An- bzw. Abwesenheit von Arthritis bei Mäusen ist relativ leicht festzustellen. Es können alle vier Pfoten betroffen sein, wobei sich die Entzündung am Höhepunkt der Arthritis (ca. 6 Wochen nach der ersten Immunisierung) vom Fußgelenk bis in alle Finger ausdehnt und durch eine starke Schwellung und Rötung (Erythem) charakterisiert ist. Um den Verlauf und Schweregrad der Arthritis während des Experiments zu verfolgen, wird dreimal pro Woche jede Pfote untersucht. Dabei wird die Schwellung der Hinterpfoten mit einem Mikrometer (Mitutoyo micrometer, Sigma Aldrich) gemessen, wobei das Gelenk ab einem Wert von 2,1 mm als arthritisch betrachtet wird. Weiterhin wird der Schweregrad der Entzündung visuell für alle vier Pfoten bewertet, wobei ein weit verbreitetes Punktesystem von 0 bis 4 verwendet wird (Tabelle 2-2, S.54).

Tabelle 2-2 | Visuelles Punktesystem zur Bewertung der Ausprägung von Arthritis in CIA-Modellen bei Nagetieren

Schweregrad der Arthritis	Pathologie
0	Keine Erythemie und Schwellung
1	Erythemie und leichte Schwellung begrenzt auf den Mittelfuß (tarsal) oder das Fußgelenk
2	Erythemie und leichte Schwellung, die sich vom Fußgelenk zum Mittelfuß ausdehnt
3	Erythemie und mäßige Schwellung, die sich vom Fußgelenk zu den Mittelfußknochen ausdehnt
4	Rötung und starke Schwellung, die das Fußgelenk, den Fuß und die Zehen umfasst

Quelle: Rosloniec, et al., 1996



Abbildung 2-4 | Arthritische Hinter- und Vorderpfoten von Kollagen II-immunisierten Mäusen. (a-c) Arthritische Hinterpfoten mit den Schweregraden 4 (a), 3 (b) und 2 (c). Die Bilder zeigen deutlich, wie sich die Entzündung mit Voranschreiten der Arthritis bis zu den Gliedmaßen ausbreitet. (d-e) Arthritische Vorderpfoten mit den Schweregraden 4 (d) und 3 (e) (Brand, et al., 2007).

Neben der Beurteilung der Pfotenschwellung wird einmal pro Woche eine Blutprobe durch retrobulbäre Punktierung genommen bzw. nach Euthanasie vom Herzen. Die Blutproben werden mit Heparin (100-200 µl) gemischt, 8 Minuten bei 4°C und 8.000 rpm zentrifugiert und

das Serum abgenommen und eingefroren. Die Seren werden nach Ende des Versuchs auf Entzündungsfaktoren wie Zytokine mittels ELISA und Kollagen II-spezifischer IgG1/IgG2-Antworten untersucht (2.6.5, S. 56).

2.6.3 Intravenöse Injektion von Lipoplex-siRNA Komplexen

Nach der klinischen Manifestation der Arthritis in den Mäusen werden diese ein- bis dreimal pro Woche intravenös mit einem siRNA-Lipoplex Gemisch injiziert. Da die Behandlung nach dem Einsatz der Arthritis erfolgt handelt es sich um einen kurativen Versuchsansatz im Gegensatz zu einem präventiven Ansatz, bei dem eine Applikation vor dem Ausbruch der Arthritis erfolgt.

2.6.3.1 Lipoplexierung von siRNA

Um die siRNA (siRNA gegen murines TAK1 bzw. eine Kontroll siRNA (siCTR) wurden von Dharmacon Research bezogen) für die *in vivo*-Applikation zu stabilisieren und die Aufnahme in die Zellen zu gewährleisten, wird sie mit Liposomen und einer Carrier-DNA komplexiert. Das Liposom ist dabei für eine bessere Aufnahme der siRNA in die Zellen verantwortlich, wohingegen die Carrier-DNA zur Stabilisierung der siRNA verwendet wird. Bei dem Liposom handelt es um ein RPR209120/DOPE-Gemisch, das wie zuvor beschrieben (Thompson, et al., 2005) hergestellt wurde. Die Lipoplexe werden bei Raumtemperatur für 30 Minuten gebildet (Frisch, et al., 2004). Pro Maus werden 10 µg siRNA (in 37,5 µl mit einer Konzentration von 20 µM) und 60 nmol Liposom (in 3 µl mit einer Konzentration von 20 nmol/µl) eingesetzt. Beide werden getrennt in dem gleichen Volumen 0,9 % Natrium-Chlorid verdünnt und 5 Minuten inkubiert. Zu der siRNA werden 10 µg Plasmid-DNA (pcDNA3, Endotoxin frei) gegeben, die dann 1:1 mit der Liposomlösung gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wird, so dass sich die Lipoplexe formen können. Diese Mischung wird den Mäusen dann intravenös appliziert.

2.6.4 Euthanasie

Zum Zeitpunkt der Euthanasie werden diverse Organe (Milz, Leber, Lymphknoten), die Pfoten, die Knie und Blutproben vom Herzen für weitere Analysen genommen.

2.6.4.1 Milzentnahme und Isolation der Splenozyten

Nach der Präparation der Milz wird diese zunächst in PBS in einem Loch einer 6-Lochplatte gelagert. Optional wird 1/3 der Milz abgeschnitten und in TriReagenz® für Protein- und RNA-Analysen bis zur Aufarbeitung (2.1.1, S.30 und 2.3.2, S.36) eingefroren. Der Rest der Milz wird mit der Rückseite des Stempels einer 5 ml-Spritze in PBS zerkleinert, bis nur noch die leere Hülle der Milz zurück bleibt. Die Zellsuspension wird über ein Zellsieb (cell strainer, 100 µm, BD Falcon #352360) in ein 50 ml Falcon überführt, das Loch mit PBS gewaschen und das Volumen mit PBS auf 20 ml aufgefüllt. Zur Lyse der Erythrozyten werden 20 ml ACK-Lysepuffer (8,29 g NH₄Cl, 200 µl EDTA (Disodiumsalz oder 0,037 g), 1 g KHCO₃) zugegeben und die Suspension gemischt. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1.200 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet einmal mit 20 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 5 ml RPMI (ohne Zusätze) aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer werden die Proben auf eine Zellzahl von 8x10⁶ c/ml eingestellt und für weitere Untersuchungen, wie die Analyse verschiedener pro- und anti-

inflammatorischer Zytokine mittels ELISA und einem Proliferationstest (2.6.5, S.56), ausgesät.

2.6.4.2 Entnahme der Lymphknoten

Die Lymphknoten an den Knien (draining lymph nodes, DLN) werden ebenfalls präpariert und anschließend in PBS gelagert. Hier werden aufgrund der geringeren Zellzahl, die aus einem Lymphknoten gewonnen werden kann, alle Lymphknoten einer Versuchsgruppe in einem Loch einer 6-Lochplatte vereinigt. Die Lymphknoten werden mit der Rückseite des Stempels einer 2 ml-Spritze zerkleinert, sodass die Zellen freigesetzt werden. Die Zellsuspension wird anschließend genauso behandelt wie die Splenozyten (2.6.4.1, S.55) und nach Zellzahlbestimmung für den Proliferationstest und die Analyse pro- und anti-inflammatorischer Zytokine mittels ELISA (2.6.5, S.56) ausgesät.

2.6.4.3 Präparation der Knie und Pfoten

Sowohl die Pfoten als auch die Knie der Mäuse werden präpariert. Nach Entfernung von Muskeln, Haut und Krallen werden die Pfoten über Nacht in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend in PBS für weitere Analysen gelagert. Die Knie werden in 48-Lochplatten, die 200 µl RPMI^{full} pro Loch enthalten, überführt, die Überstände 24 Stunden später abgenommen und für die Messung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen mittels ELISA und IgG1/IgG2-Untersuchungen (2.6.5, S.56) verwendet. Bis zur Analyse werden die Überstände bei -20°C gelagert. Die Knie werden in PBS überführt und ebenfalls bei -20°C für spätere RNA und Proteinanalysen (2.1.1, S.30 und 2.3.2, S.36) gelagert.

2.6.5 Zytokin und Anti-Kollagen II-Untersuchungen

2.6.5.1 Kollagen II-spezifische IgG1- und IgG2-Antworten

Die Produktion von Antikörpern gegen bovines Kollagen II (bCII) spiegelt die Anfälligkeit für Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) wider und ist charakterisiert durch ein hohes IgG2a:IgG1-Verhältnis. Um Rückschlüsse auf den Verlauf der Arthritis bezüglich der Antikörperproduktion gegen bCII ziehen zu können, werden die IgG2a- und IgG1-Mengen mittels ELISA in den Seren, die einmal wöchentlich und am Tag der Euthanasie des Experiments genommen wurden (2.6.2, S.54), bestimmt.

Dazu werden NUNC Maxisorb-Platten mit 5 µg/ml bCII Protein beschichtet (50 µl/well in PBS verdünnt). Die Platte wird über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wird die Platte 3x mit PBS gewaschen, mit 200 µl PBS/2 % BSA pro Loch für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3x mit PBS/0,05 % Tween-20 gewaschen. Für die Standardkurve werden Seren von unbehandelten, arthritischen Mäusen in den Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1.600 verwendet. Für die Proben aus den Versuchstieren werden 1:100 und 1:200 Verdünnungen (Proben von Tag 15 bis Tag 27) bzw. 1:200 und 1:400 Verdünnungen (Proben von Tag 28 bis zum Ende des Experiments) verwendet. Pro Loch werden je 50 µl der Standards und der Proben eingesetzt. Die Platte wird über Nacht bei 4°C oder 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird 3x mit PBS/0,05 % Tween-20 gewaschen und mit 50 µl des zu detektierenden Antikörpers IgG1 oder IgG2a (1:1000 in PBS) inkubiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wird 3x mit PBS/0,05 % Tween-20 und einmal mit PBS gewaschen. Für die Entwicklung

werden 50 µl Substratlösung pro Loch zugesetzt und bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich eine Färbung einstellt. Die Messung erfolgt im ELISA-Reader bei 405 nm.

IgG2a – Antikörper:	AKP-antimouse IgG2a, BD Bioscience #553389
IgG1 – Antikörper:	AKP-antimouse IgG1, BD Bioscience #557272
Glycin-Puffer (0,1 M; pH 10,4):	7,5 g Glycine; 0,203 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,288 g ZnSO_4 ; mit Wasser auf 1 L auffüllen und pH mit 1M NaOH einstellen
Substratlösung:	p-Nitrophenyl-Phosphat (PnPP, Sigma, #N2765) in Glycin-Puffer (0,1M; pH=10,4)

2.6.5.2 Proliferationsassay

Für den Proliferationsassay werden die isolierten Splenozyten und Lymphozyten in 96-Lochplatten mit 8.100 Zellen pro Loch ausgesät (100 µl der Zellsuspension). Dabei wurde dem Kulturmedium entweder Concanavalin A (Con A, 2 µg/ml) oder verschiedene Konzentrationen an bCII (0, 5, 10 oder 50 µg/ml) zugesetzt. Für jede Probe werden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Concanavalin A dient dabei als Positivkontrolle für die Vitalität der T-Zellen in Milz und Lymphknoten, da es in der Lage ist, T-Zellen, wahrscheinlich über den CD3-Komplex, zu stimulieren und damit zur Proliferation anzuregen. Die Immunantwort auf Con A sollte in allen isolierten Zellen gleich sein. Weiterhin soll durch die verschiedenen bCII-Konzentrationen getestet werden, ob durch die Anwesenheit von bCII die T-Zellen aktiviert und damit zur Proliferation angeregt werden können. Diese sollte mit steigenden Konzentrationen an bCII ebenfalls zunehmen.

Um die Proliferation der Zellen aus Milz und Lymphknoten zu testen, wird ein Lumineszenzbasiertes Untersuchungssystem verwendet (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, #G7571). Dabei wird anhand der Quantifizierung des vorhandenen ATPs, welches ein Indikator für stoffwechselaktive Zellen ist, die Vitalität der Zellen getestet. Für die Luziferase-Messung werden 24- und 48-Stunden nach der Aussaat 50 µl Zellsuspension in weiße 96-Lochplatten überführt. In jedes Loch werden 50 µl der CellTiter-Glo®-Reagenz gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Reagenz werden die Zellen lysiert und es entsteht ein Lumineszenz-Signal, welches proportional zur vorhandenen ATP Menge ist. Anschließend erfolgt die Messung der Luziferase-Aktivität mit einem Luminometer.

2.6.5.3 Quantifizierung verschiedener Zytokine mittels ELISA

Die Sekretion verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine wurde in den Medienüberständen der Knie 24 und 48 Stunden nach der Euthanasie (2.6.4.3, S.56), in den Seren (2.6.2, S.54) und in den Überständen der kultivierten Lymphozyten und Splenozyten gemessen. Letztere wurden dafür nach der Euthanasie und Isolation in 24-Lochplatten mit $2,4 \times 10^6$ Zellen pro Loch (300 µl Zellsuspension) ausgesät. Dabei wurden sowohl die Splenozyten als auch die Lymphozyten entweder mit 1 µg/ml ConA, 50 µg/ml bCII oder ohne Zusätze in 2x RPMI kultiviert. Die Überstände wurden 24 Stunden später genommen und bis zur weiteren Verwendung beim ELISA eingefroren.

Eine 96-Lochplatte (Nunc Maxisorb Nr.446469) wird mit 100 µl Antikörperlösung (verdünnt in Bindungslösung, 1-4 µg/ml) für das entsprechende, nachzuweisende Zytokin versehen und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Platten werden am nächsten Tag bei Raumtemperatur äquilibriert und die Antikörperlösung wird entfernt. Um eine nicht-spezifische Bindung zu verhindern werden 200 µl Blockierungslösung pro Loch zugegeben und 1-2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Platten werden dann mindestens dreimal mit PBS/Tween gewaschen. Anschließend werden 100µl pro Loch der Proben und Standards (verdünnt in Blockierungslösung mit Tween) zugesetzt und die Platten werden 2-4 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten werden anschließend mindestens 4x mit PBS/Tween gewaschen. Der Biotinylierte-Detektionsantikörper gegen das entsprechende Zytokin wird auf 0,5-2 µg/ml in Blockierungslösung/Tween verdünnt und es werden 100 µl des verdünnten Antikörpers pro Loch zu den Proben pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur und unter Schütteln werden die Platten mindestens 4x mit PBS/Tween gewaschen. Die Detektion erfolgt mit der Avidin-Meerrettich-Peroxidase (Av-HRP, #554058), welche zuvor in Blockierungslösung/Tween verdünnt wurde, wobei 100 µl pro Loch zugegeben werden. Die Platten werden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mindestens 5x mit PBS/Tween gewaschen. Für die Substratlösung werden 100 µl 3 % H₂O₂ zu 11 ml Substrat (ABTS) gegeben und 100 µl pro Loch zugesetzt. Die Platten werden bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich eine Färbung einstellt (5-80 Minuten). Die OD wird für jedes Loch in einem ELISA Reader bei 405 nm bestimmt.

Lösungen

Bindungslösung: 0,1 M Na HPO₄, pH 9,0 oder pH 6,0, eingestellt mit 0,1 M NaH₂PO₄

PBS-Lösung: 80,0 g NaCl, 11,6 g Na₂HPO₄, 2,0 g KH₂PO₄, 2,0 g KCl / 10 L; pH 7,0

PBS/Tween: 0,5 ml Tween[®]-20 in 1 L PBS

Blockierungspuffer: 10% FCS in PBS; filtriert

Blockierungspuffer/Tween: 0,5 ml Tween[®]-20 in 1 L Blockierungslösung

ABTS-Substrat: 150 mg 2,2'-Azino-bis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma, #A-1888) werden zu 500 ml 0,1 M wasserfreier Zitronensäure (Fisher; #A-940) in destilliertem H₂O gegeben; pH 4,35 mit NaOH. Die Lösung wird in 11 ml-Aliquots eingefroren; vor der Verwendung werden 100 µl 3% H₂O₂ zugesetzt

3% H₂O₂-Lösung: 10 ml 30% H₂O₂ werden zu 90 ml destilliertem H₂O gegeben; vor Licht schützen

3 Ergebnisse

Die TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) besitzt wie bereits erwähnt eine Schlüsselrolle bei der Weiterleitung inflammatorischer Signale und kann in verschiedenen Zelltypen durch Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert werden. Je nach Stimulus und Zelltyp werden verschiedene nachgeschaltete Signalwege durch das aktivierte TAK1 stimuliert, wie die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38, c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) sowie der Transkriptionsfaktor Nuklear-Faktor- κ -B (NF κ B). Diese regulieren ihrerseits die Transkription inflammatorischer Gene, unter anderem für Zytokine. Über die Inhibierung von TAK1 könnte die Weiterleitung der inflammatorischen Signale und damit die Zellantwort auf den inflammatorischen Stimulus eingeschränkt werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Inhibierung bzw. Inaktivierung von TAK1 auf die Zytokin-abhängige Aktivierung von MAP-Kinasen und NF κ B *in vitro* untersucht. Dabei wurden zwei Strategien verfolgt: Zum einen wurde der Einfluss der Inhibierung von endogenem TAK1 über eine TAK1-spezifische siRNA in einer murinen Makrophagenzelllinie untersucht, da Makrophagen ein zentrales Zellsystem der angeborenen Immunabwehr darstellen und durch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie Matrix-abbauenden Proteasen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Inflammation als auch der Gewebedegradation in der rheumatoiden Arthritis spielen. Zum anderen wurde der Einfluss der Überexpression einer Kinase-inaktiven, dominant-negativen Form von TAK1 in einer murinen, mesenchymalen Vorläuferzelllinie untersucht. Bei den mesenchymalen Zellen handelt es sich um ein in die Gewebekonstruktion involviertes Zellsystem, das insbesondere an der Regeneration des beschädigten Knochen- und Knorpelgewebes im rheumatischen Gelenk beteiligt ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde dann *in vivo* geprüft, ob die Inhibierung der TAK1-abhängigen Signalvermittlung den Verlauf und die Ausprägung der rheumatoiden Arthritis beeinflusst. Dazu wurde das weithin anerkannte Kollagen-induzierte Arthritismodell in der Maus gewählt, welches der humanen Erkrankung in Symptomen und Verlauf ähnlich ist.

3.1 Einfluss der TAK1-Inhibition/Inaktivität auf die inflammatorische Signaltransduktion *in vitro*

3.1.1 TAK1-Inaktivierung interferiert mit MAPK- und NF κ B-Signalwegen in murinen mesenchymalen Progenitorzellen (C3H10T $\frac{1}{2}$)

Um die Beeinflussung der Aktivierung von MAPK- und NF κ B-Signalwegen *in vitro* zu untersuchen, wurde die murine mesenchymale Progenitorzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$ verwendet. Diese kann faktorabhängig in osteo-, chondro-, adipo- und tendogene Richtungen differenzieren (Wang, et al., 1993; Ahrens, et al., 1993). Mesenchymale Progenitorzellen sind im rheumatoiden Synovium vorhanden (De Bari, et al., 2001) und sie sind in normalem Knorpel in dessen

Reparatur und unter pathologischen Bedingungen wie der Arthritis in das Remodeling von Knorpel involviert. Zytokine wie IL-1 und TNF α , die in hohen Konzentrationen im rheumatoiden Synovium vorhanden sind, interferieren mit der chondrogenen Differenzierung der Progenitorzellen (Murakami, et al., 2000) und könnten dazu führen, dass diese nicht mehr in der Lage sind, auf die entstehenden Knorpeldefekte zu reagieren (Alsalameh, et al., 2004). Eine Inhibierung der Signalweiterleitung der IL-1- und TNF α -Stimuli durch die Inaktivierung bzw. Inhibierung von TAK1 könnte so die Differenzierungseigenschaften wiederherstellen, zumal in früheren Studien schon gezeigt werden konnte, dass die Expression einer dominant-negativen Form von TAK1 (dnTAK1) in mesenchymalen Progenitorzellen mit einer gesteigerten BMP2-induzierten Osteogenese einhergeht, während die Wildtyp-Form von TAK1 (wtTAK1) diese inhibiert (Hoffmann, et al., 2005).

Um den Einfluss der Inaktivierung von TAK1 auf die Zytokin-induzierte Aktivierung von MAPK-Signalwegen in den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen Lentiviren für dominant-negatives TAK1 oder als Kontrolle mit GFP („green fluorescent protein“) infiziert und die Genexpression durch Zugabe von Doxyzyklin zum Kulturmedium aktiviert (vgl. 2.5.2, S.49). Die infizierten und dominant-negatives TAK1 bzw. GFP-exprimierenden Zellen wurden anschließend unterschiedlich lange mit IL-1 stimuliert. Die Aktivierung der MAPK-Signalwege wurde mittels Western Blot analysiert, die Ergebnisse sind in Abbildung 3-1 dargestellt.

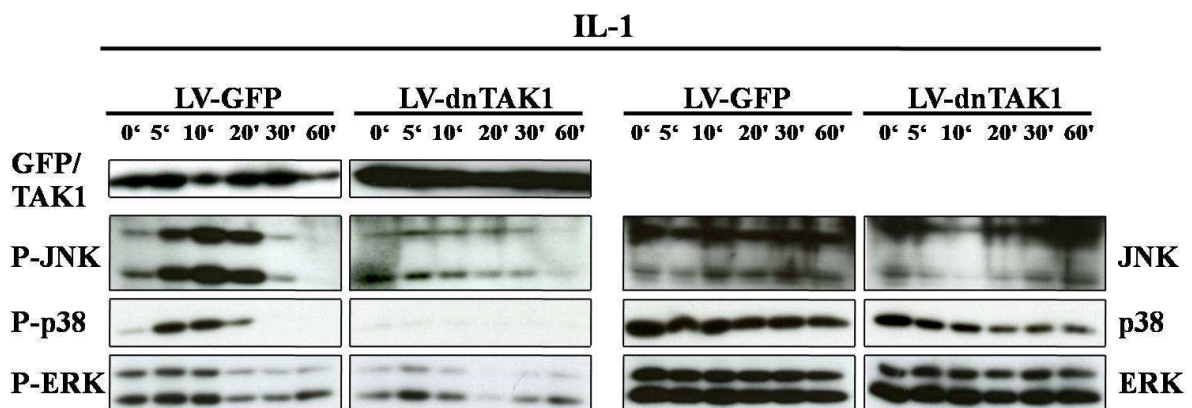


Abbildung 3-1 | Einfluss der Inaktivität von TAK1 auf IL-1-induziertes MAPK-Signaling in murinen mesenchymalen Vorläuferzellen (C3H10T $\frac{1}{2}$). C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurden mit dominant-negativem TAK1 (dnTAK1) bzw. GFP-Lentiviren infiziert und unterschiedlich lange mit IL-1 stimuliert. Nach Verifikation der Genexpression von dnTAK und GFP (oben links) wurde der Einfluss auf die MAPK-Signalwege untersucht. Links sind die phosphorylierten, aktivierten Kinasen JNK, p38 und ERK und rechts die jeweiligen Gesamtkinasen dargestellt.

Die Expression sowohl von dnTAK als auch von GFP konnte in den Zellextrakten der infizierten und anschließend stimulierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3-1, links oben). Die gleichmäßige Expression der Gesamtkinasen von p38, ERK und JNK zeigt eine vergleichbare Proteinbeladung der einzelnen Proben an (Abbildung 3-1, rechts). Durch die Stimulation mit IL-1 (20 ng/ml) kommt es in den GFP infizierten Kontrollzellen bereits nach 5 Minuten zu einer transienten Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK und p38, die 30 Minuten anhält, während ERK nur unwesentlich aktiviert wird. In Anwesenheit von dnTAK wird die Phosphorylierung sowohl von JNK als auch von p38 inhibiert. TAK1 ist

also in die IL-1 abhängige Aktivierung von p38 und JNK in C3H10T $\frac{1}{2}$ Zellen involviert (Abbildung 3-1, links).

Im NF κ B-Signalweg wird NF κ B durch inhibitorische- κ -B-Proteine (I κ B) im Zytoplasma der Zellen inaktiv gehalten. Nach einem inflammatorischen Stimulus werden die I κ B-Proteine phosphoryliert und damit für die Degradation markiert. NF κ B wird freigegeben und wandert in den Zellkern, um die Transkription NF κ B-abhängiger, u.a. inflammatorischer Gene, zu aktivieren. TAK1 ist dabei in die Vermittlung von NF κ B-Signalwegen involviert. Um dies in C3H10T $\frac{1}{2}$ Zellen zu testen, wurden erneut GFP- und dnTAK-infizierte Zellen unterschiedlich lange mit IL-1 stimuliert. Kurz nach der Stimulation wird I κ B (inhibitorisches- κ -B Protein) in den GFP-exprimierenden Kontrollzellen phosphoryliert (Abbildung 3-2, links unten) und damit für die Degradation markiert, die bereits 5 Minuten nach der Stimulation einsetzt (Abbildung 3-2, links oben). Nach fast vollständiger Degradation von I κ B nach 30 minütiger Stimulation wird es nach 60 Minuten wieder stabilisiert und ist erneut im Blot nachweisbar. In den dnTAK1 exprimierenden Zellen hingegen findet keine IL-1-induzierte Phosphorylierung und damit Degradierung von I κ B statt (Abbildung 3-2, rechts). I κ B kann über den gesamten Stimulationszeitraum nachgewiesen werden und es ist nur eine geringfügige Phosphorylierung nachweisbar. Die Inaktivierung von TAK1 durch die Expression der dominant-negativen Form von TAK1 verhindert also die IL-1-induzierte Aktivierung von NF κ B.

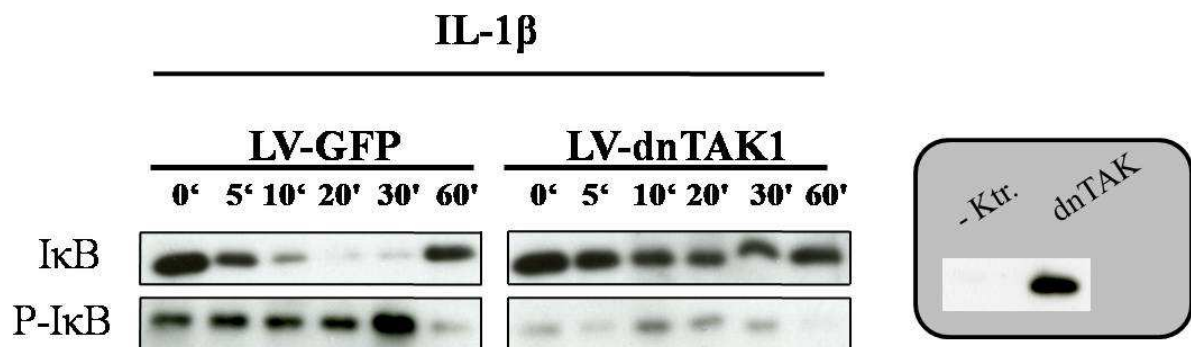


Abbildung 3-2 | Einfluss der Aktivität von TAK1 auf IL-1-induziertes NF κ B-Signaling in murinen mesenchymalen Vorläuferzellen (C3H10T $\frac{1}{2}$). C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurden mit GFP- bzw. dnTAK1-Lentiviren infiziert und mit IL-1 β für verschiedene Zeiten stimuliert. Der Einfluss von dnTAK1 auf die IL-1 β -induzierte Aktivierung von NF κ B wurde über I κ B (Inhibitorisches- κ -B-Protein) und dessen Phosphorylierung nachgewiesen. Die Expression von dnTAK führt dabei zu einer Stabilisierung von I κ B und einer verminderten Phosphorylierung im Gegensatz zu den GFP-exprimierenden Kontrollzellen. Dies zeigt eine verringerte NF κ B-Aktivität an.

Dieser Einfluss von dnTAK auf die Aktivierung von NF κ B konnte auch mit Hilfe eines Reportertestsystems nachgewiesen werden. Hierbei steht das Reportergen der Luziferase unter einem NF κ B-abhängigen Promotor und wird nur durch die Aktivierung von NF κ B aktiviert. Die exprimierte Luziferase kann dann mittels ihrer enzymatischen Aktivität detektiert werden. Dieses Reporterkonstrukt wurde stabil in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eingebracht, die anschließend lentiviral für die Expression von GFP und dnTAK infiziert wurden. Die Zellen wurden für verschiedene Zeitpunkte entweder serumfrei (s/f) oder mit IL-1, TNF α und LPS stimuliert. Der Grad der Zytokin-abhängigen Aktivierung wurde über die Bestimmung der Luziferase-Aktivität gemessen und ist in Abbildung 3-3, S.62 dargestellt.

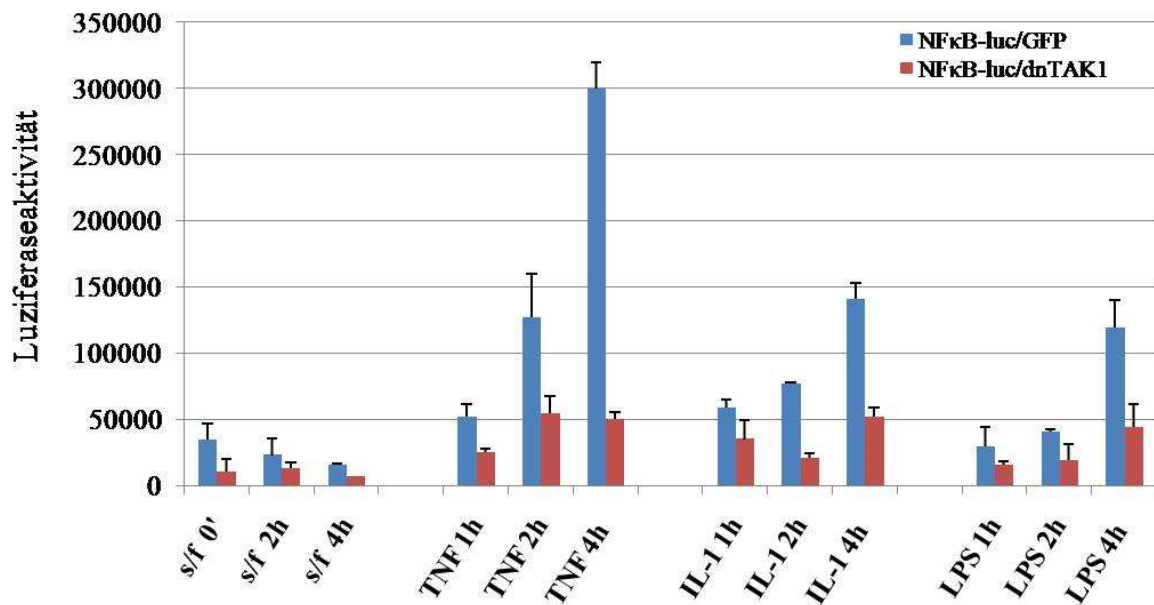


Abbildung 3-3 | Einfluss von dnTAK auf die Zytokin-abhängige Aktivierung eines NFκB-Luziferase-Reportersystems. C3H10T½-Zellen wurden stabil mit einem NFκB-luc-Reporterplasmid transfiziert und anschließend mit dnTAK- und GFP-Lentiviren infiziert. Die basale Aktivität des Reporters wurde durch die Inkubation der Zellen unter serumfreien (s/f) Bedingungen bestimmt. Nach der Stimulation der Zellen mit TNF, IL-1 oder LPS für verschiedene Zeitpunkte wurde die dadurch induzierte, NFκB-abhängige Luziferaseaktivität gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Aktivierung der Luziferase in den dnTAK1-exprimierenden Zellen nach der Zytokin- bzw. LPS-Stimulation deutlich gegenüber den GFP-Kontrollen reduziert ist. Dies ist auf eine verminderte NFκB-Aktivierung zurückzuführen.

Die basale Aktivität des Reportersystems wurde unter serumfreien Bedingungen in den GFP- und dnTAK-exprimierenden C3H10T½-Zellen bestimmt. Diese ist in den dnTAK-exprimierenden Zellen schon deutlich im Vergleich zu den GFP-Kontrollen herabgesetzt und zeigt, dass die alleinige Anwesenheit von dnTAK1 ohne Stimulus die Grundaktivität von NFκB verringert. Der Einfluss von dnTAK1 auf die NFκB-Aktivierung wird deutlicher, wenn die Zellen mit Zytokinen bzw. LPS stimuliert werden. Hier zeigt sich in den GFP-Kontrollzellen eine deutliche Aktivierung des Luziferasereporters und damit von NFκB, die mit zunehmender Stimulationszeit ansteigt (blaue Balken). Dabei wird NFκB am stärksten durch TNFα aktiviert. Die Aktivierung ist in den dnTAK1-exprimierenden und stimulierten Zellen deutlich herabgesetzt und steigt auch mit zunehmender Stimulationszeit nur unwesentlich an (Abbildung 3-3). Die Inaktivität von TAK1 führt also zu einer Inhibierung der NFκB-Aktivierung und verhindert die Bindung von NFκB an seinen Promotor und damit die Ableitung NFκB-abhängiger Zielgene.

Diese Daten zeigen, dass die Inaktivierung von TAK1 durch die Überexpression einer inaktiven, dominant-negativen Form von TAK1 die IL-1-induzierte Aktivierung von p38, JNK und NFκB in mesenchymalen Vorläuferzellen inhibiert. Diese Versuche bilden die Grundlage für gentherapeutische *in vivo*-Studien an einem Kollagen-induzierten Arthritismodell.

3.1.2 Inhibition der TAK1 Expression durch siRNA

Um die Aktivität von TAK1 *in vitro* und *in vivo* zu beeinflussen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Neben der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Verwendung eines lentiviralen Systems und einer dominant-negativen Form von TAK1 involviert eine andere Strategie den Einsatz einer inhibitorischen RNA (siRNA) gegen TAK1.

Um den Einfluss der Inhibition der TAK1-Expression mittels siRNA auf die inflammatorischen Signalwege *in vitro* und *in vivo* untersuchen zu können, musste zunächst die Funktionalität der TAK1-spezifischen siRNA getestet werden.

Dazu wurden eine Makrophagen-Zelllinie (J774.1) verwendet, die sowohl mit der siRNA gegen TAK1 als auch einer Kontroll-siRNA (siCTR) mit zufälliger Nukleotidsequenz transfiziert wurde. Der Nachweis der Inhibition von TAK1 durch die transfizierte siRNA erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion auf RNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR sowie durch Western Blot-Analysen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-4, S. 63 dargestellt.

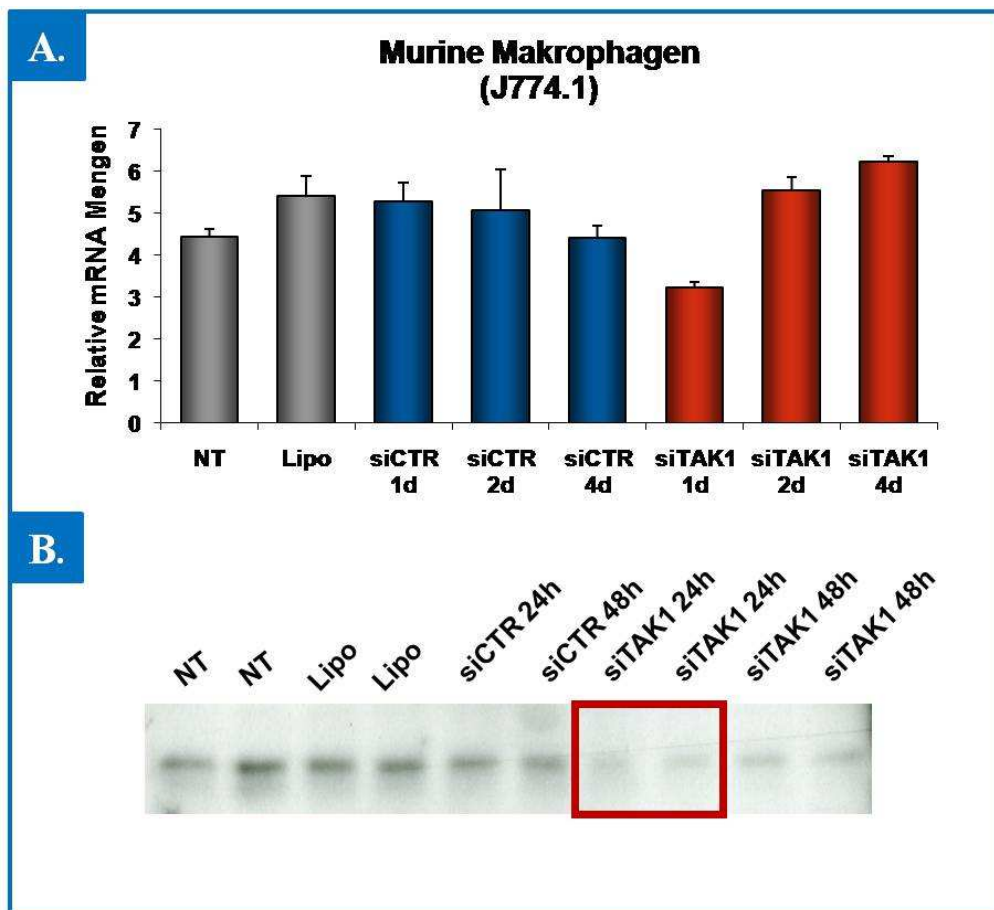


Abbildung 3-4 | *Inhibition der TAK1-Expression in vitro*. Murine Makrophagen (J774.1) wurden *in vitro* mit einer TAK1-spezifischen siRNA (siTAK1) und einer unspezifischen Kontroll-siRNA (siCTR) transfiziert. Die TAK1-Expression wurde auf RNA Ebene mittels quantitativer RT-PCR (A) und Proteinebene mittels Western Blot (B) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion bestimmt. 24 Stunden nach der siRNA Transfektion konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine deutliche Reduktion der TAK1-Expression in den siTAK1-behandelten Zellen nachgewiesen werden, die nach 48 Stunden wieder ansteigt. Als Kontrollen dienten nicht-transfizierte (NT), Lipofektamin-behandelte (Lipo) und siCTR-transfizierte Zellen.

Eine Reduktion der TAK1-Expression nach der siRNA-Transfektion konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Diese war 24 Stunden nach der Transfektion am stärksten und nahm nach 48 Stunden wieder ab. Auf RNA-Ebene konnte dabei eine Reduktion um 30 % erreicht werden. Für alle folgenden *in vitro* Versuche wurden die Zellen aufgrund dieser Ergebnisse 24 Stunden mit der TAK1-siRNA behandelt, um eine optimale Inhibition zu erreichen.

3.1.3 Einfluss der siRNA-abhängigen TAK1-Inhibition auf die MAPK-Signalwege in einer murinen Makrophagenzelllinie (J774.1)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch die Behandlung mit einer TAK1-spezifischen siRNA die TAK1-Expression auf RNA- und Proteinebene inhibiert werden konnte, stellte sich als nächstes die Frage, inwiefern diese Inhibition von TAK1 einen Einfluss auf die Zytokin- bzw. LPS-abhängige Aktivierung der MAPK-Signalwege hat. Hierfür wurde die murine Makrophagen Zelllinie J774.1 verwendet. Die Makrophagen wurden 24 Stunden mit einer Kontroll-siRNA oder einer TAK1-spezifischen siRNA (2.4.7.2.2, S.44) behandelt und anschließend mit TNF α (20 ng/ml) oder LPS (1 μ g/ml) für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Die Aktivierung der MAPK-Signalwege p38, JNK und ERK sowie deren Beeinflussung durch die Inhibition von TAK1 wurde mittels Western Blot zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6 dargestellt.

In allen durchgeführten Stimulationen konnte die Expression von TAK1 durch die siRNA Behandlung im Vergleich zu den siCTR-behandelten Zellen reduziert werden (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6, oben). Weiterhin zeigt eine gleichmäßige Expression der Gesamtkinasen von p38, ERK und JNK eine einheitliche Proteinbeladung an und gewährleistet somit die Vergleichbarkeit der einzelnen Zeitpunkte (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-6, rechte Seite).

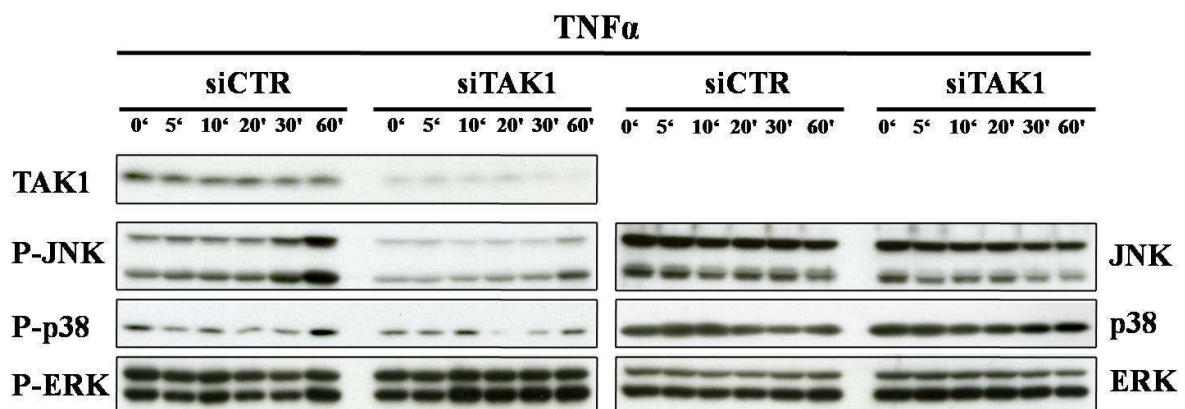


Abbildung 3-5 | Einfluss der Inhibition von TAK1 auf TNF α -induziertes MAPK-Signaling in murinen Makrophagen (J774.1). Murine Makrophagen wurden 24 Stunden mit einer siRNA gegen TAK1 bzw. einer Kontroll-siRNA behandelt und anschließend 0 bis 60 Minuten mit 20 ng/ml TNF α stimuliert. In den Zellextrakten wurde die Expression der Gesamtkinasen (rechte Seite) sowie der phosphorylierten, aktivierten Kinasen (linke Seite) nachgewiesen.

Die TNF α -abhängige Aktivierung der MAPK-Signalwege ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Dabei zeigt sich nur eine geringfügige Aktivierung von p38 und ERK nach 60 Minuten Stimulation in den siCTR-Zellen, während JNK nach 30 und 60 Minuten Stimulation deutlich phosphoryliert und damit aktiviert wird. Die anderen Zeitpunkte weisen die basale Aktivität

3. Ergebnisse

auf und entsprechen der Intensität des Nullwertes. Aufgrund der geringfügigen p38-Aktivierung durch TNF α konnte durch die TAK1-Inhibierung kein Einfluss auf diesen Signalweg festgestellt werden. Die ERK-Aktivierung wird durch die Inhibierung von TAK1 geringfügig ab dem 10 Minuten Zeitpunkt im Vergleich zu den siCTR-Zellen verstärkt. Eine deutliche Beeinflussung zeigt sich jedoch bei der TNF α -abhängigen JNK-Aktivierung, die in den siTAK1-behandelten Zellen deutlich reduziert ist (Abbildung 3-5).

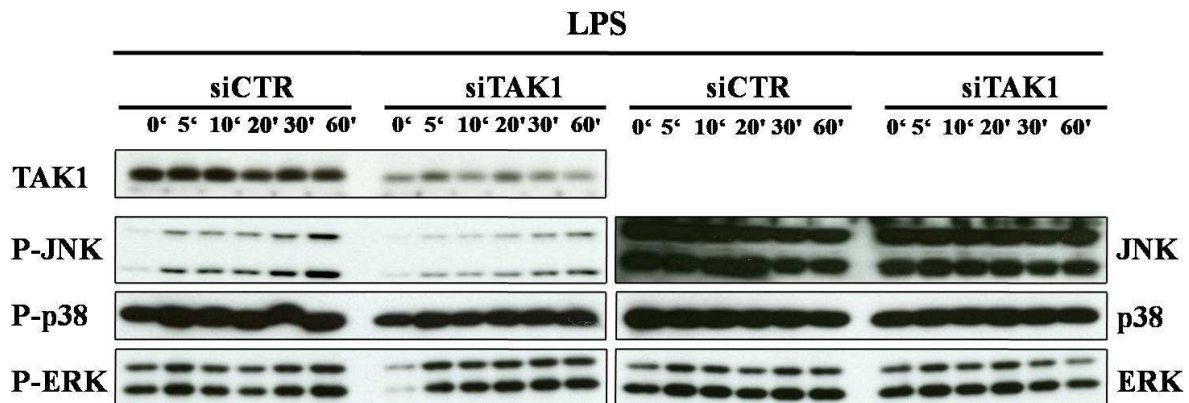


Abbildung 3-6 | Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf LPS-induziertes MAPK-Signaling in murinen Makrophagen (J774.1). Murine Makrophagen wurden 24 Stunden mit einer siRNA gegen TAK1 bzw. einer Kontroll-siRNA behandelt und anschließend 0 bis 60 Minuten mit 1 μ g/ml LPS stimuliert. In den Zellextrakten wurde die Expression der Gesamtkinasen (rechte Seite) sowie der phosphorylierten, aktivierten Kinasen (linke Seite) nachgewiesen.

Die LPS-abhängige Aktivierung der MAPK-Signalwege ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Auch hier ist keine Aktivierung von p38 und nur eine geringfügige Aktivierung von ERK durch LPS feststellbar, wobei keine Beeinflussung durch die Inhibierung von TAK1 erfolgt. Der JNK-Signalweg hingegen kann nach 5 Minuten Stimulation mit LPS aktiviert werden und wird durch die siTAK1-Behandlung geringfügig inhibiert.

Insgesamt zeigen die Experimente, dass eine TNF α - oder LPS- Stimulation zu keiner Aktivierung der p38 und ERK MAPK-Signalweg in der untersuchten Makrophagenzelllinie J774.1 führt und deshalb kein Einfluss der TAK1-Inhibition durch die siRNA Behandlung auf diese Signalwege gezeigt werden konnte. JNK konnte geringfügig durch LPS, IL-1 und TNF α aktiviert werden und diese Aktivierung wurde durch die siTAK1-Behandlung leicht reprimiert. Dieses Verhalten der Makrophagenzelllinie J774.1 entsprach keineswegs den Erwartungen, da Makrophagen normalerweise schnell und intensiv mit einer Aktivierung der MAPK Signalwege auf eine Stimulation mit LPS oder TNF α reagieren sollten. Um den Einfluss einer siRNA-abhängigen Inhibierung von TAK1 auf Entzündungsprozesse und eine potentielle therapeutische Anwendung zu untersuchen, wurden *in vivo*-Versuche an einem Kollagen-induzierten Arthritismodell in der Maus durchgeführt.

3.2 Einfluss der Inhibierung von TAK1 in einem Kollagen-induzierten Arthritis-Modell

3.2.1 siRNA-abhängige anti-TAK1-Strategie zur kurativen Behandlung von arthritischen DBA/1-Mäusen

TAK1 ist, wie eingangs beschrieben, ein zentraler inflammatorischer Signalmediator, der die Signale von aktivierten IL-1-, TNF α - und Toll-like-Rezeptoren vermittelt und damit maßgeblich an Entzündungsreaktionen und Gewebeerstörung, wie sie in der rheumatoiden Arthritis auftreten, beteiligt sein könnte. Die Hypothese war, dass eine Inhibition der TAK1 Expression durch eine anti-TAK1 siRNA Applikation zu einer verminderten inflammatorischen Reaktion in der rheumatoiden Arthritis führen sollte. Dies wurde in einem Kollagen-induzierten Arthritismodell getestet. Es wurde hierzu ein kurativer Versuchsansatz gewählt, bei dem die Behandlung mit der siRNA nach der klinischen Manifestation der Arthritis erfolgt und somit vergleichbar zu einer etablierten rheumatoiden Arthritis ist (Abbildung 3-7).

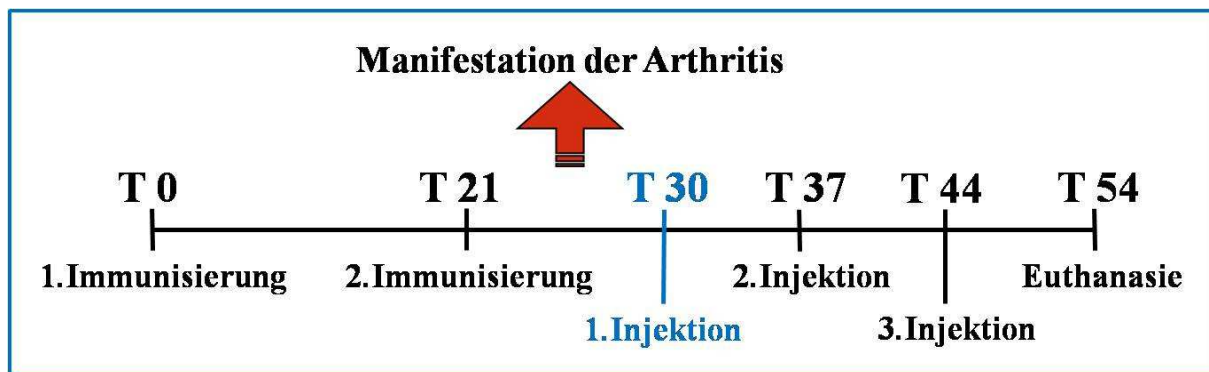


Abbildung 3-7 | Zeitschema eines kurativen Versuchsansatzes für Kollagen-induzierte Arthritis. Die Mäuse werden am Tag 0 mit einer Mischung aus bovinem Kollagen Typ II und komplettem Freund'schem Adjuvans immunisiert. Nach 21 Tagen erfolgt eine erneute Immunisierung mit bovinem Kollagen II und inkomplettem Freund'schem Adjuvans. Nach der klinischen Manifestation der Krankheit, die in einem Zeitraum von 21 bis 28 Tagen nach der ersten Immunisierung beobachtet werden kann, erfolgt wöchentlich eine intravenöse Applikation der siRNA.

Für die Induktion der Arthritis werden männliche DBA/1-Mäuse mit einer Mischung aus bovinem Kollagen II und komplettem Freund'schem Adjuvans immunisiert. Drei Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgt eine erneute Immunisierung mit bovinem Kollagen II und inkomplettem Freund'schem Adjuvans. In dem Zeitraum von 21 bis 28 Tagen nach der ersten Immunisierung treten erste klinische Symptome der Arthritis auf. Vorder- und Hinterpfoten der Mäuse beginnen aufgrund der einsetzenden Entzündung im Gelenk und der damit einhergehenden Infiltration von Leukozyten anzuschwellen und sich zu röten (Abbildung 3-8, S.67). Die Pfotenschwellung und Rötung nimmt im Verlauf der Krankheit stark zu und führt zu einer massiven Gelenkzerstörung. Nachdem die ersten Anzeichen einer klinischen Manifestation der Krankheit auftreten, beginnt die Anwendung der siRNA. Um die siRNA für die *in vivo* Applikation zu stabilisieren und die Aufnahme in die Zellen zu gewährleisten, wird sie mit Liposomen (Gemisch aus RPR209120 und DOPE) und einer Carrier-DNA komplexiert (vgl. 2.6.3.1, S.55). Die entstehenden Lipoplexe werden den Mäusen intravenös in die Schwanzve-

ne injiziert, wobei eine Konzentration von 0,5 mg/kg siRNA eingesetzt wird. Die Injektionen erfolgen einmal pro Woche.

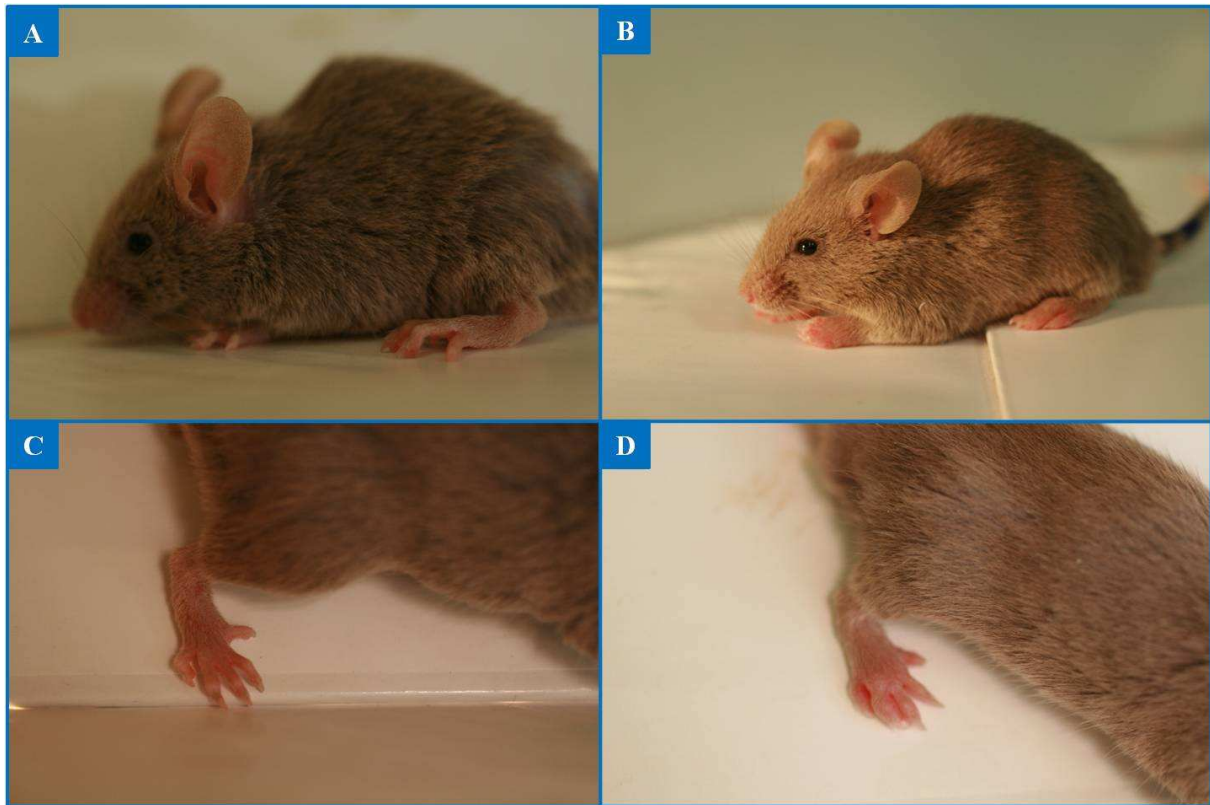


Abbildung 3-8 | *Kollagen-induzierte Arthritis in DBA/1-Mäusen.* Darstellung einer gesunden (A, C) und einer arthritischen (B, D) DBA/1 Maus. Nach der Immunisierung mit Kollagen Typ II entwickeln die Mäuse eine starke Arthritis, die mit der Anschwellung und Rötung von Vorder- und Hinterpfoten einhergeht, wie in Abb. B sehr gut zu erkennen ist. Die Detailaufnahmen in C und D zeigen die Pfote einer gesunden Maus © und im direkten Vergleich dazu die angeschwollene und gerötete Hinterpfote einer Maus mit Kollagen-induzierter Arthritis (D).

3.2.2 Die Inhibierung von TAK1 reduziert Pfortenschwellung und Häufigkeit von Kollagen-induzierter Arthritis

Im Verlauf der Experimente wird der makroskopische Verlauf und Schweregrad der Arthritis bei den DBA/1-Mäusen dreimal pro Woche untersucht. Dabei wird die Schwellung der Hinterpfoten mit einem Mikrometer (Mitutoyo micrometer, Sigma Aldrich) gemessen, wobei das Gelenk ab einem Wert von 2,1 mm als arthritisch betrachtet wird. Der Einfluss der Behandlung mit einer TAK1-spezifischen siRNA im Vergleich zu einer Kontroll-siRNA mit zufälliger Nukleotidsequenz (siCTR) oder PBS-behandelten Kontrollen (CTR) wurde in mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten evaluiert, wobei 6 bis 10 Mäuse pro Gruppe eingesetzt wurden, um eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Im ersten Experiment wurden 10 Mäuse für jede Gruppe verwendet. Die ersten klinischen Anzeichen einer Arthritis zeigten sich 28 Tage nach der ersten Immunisierung. Alle drei Mausgruppen zeigten gerötete und angeschwollene Pfoten, wobei der Durchschnittswert über 2,1 mm lag und damit eine Arthritis anzeigte. Infolgedessen wurde die erste intravenöse siRNA Injektion am Tag 30 nach der ersten Immunisierung durchgeführt. In der Mausgruppe, die mit einer siRNA gegen TAK1 behandelt wurde, sank der Wert für die Pfortenschwellung be-

3. Ergebnisse

reits drei Tage nach dieser ersten Injektion deutlich unter den arthritischen Wert von 2,1 mm ab (Abbildung 3-9, rote Linie), während die Pfortenschwellungen der Kontrollmäuse (CT, schwarze Linie und siCTR, blaue Linie) weiter zunahmen und sich die Arthritis verschlimmerte. Durch eine zweite siRNA-Injektion am Tag 37 konnte die Pfortenschwellung in den siTAK1-behandelten Mäusen konstant gehalten werden und stieg erst gegen Ende des Experiments bis zum Tag 42 leicht wieder an, blieb aber dennoch unter dem arthritischen Schwellenwert von 2,1 mm. Die Kontrollmäuse hingegen entwickelten eine zunehmend starke Arthritis und wiesen am Ende des Experiments Pfortenschwellungen von 2,3 mm (siCTR) und 2,35 mm (CT) auf (Abbildung 3-9).

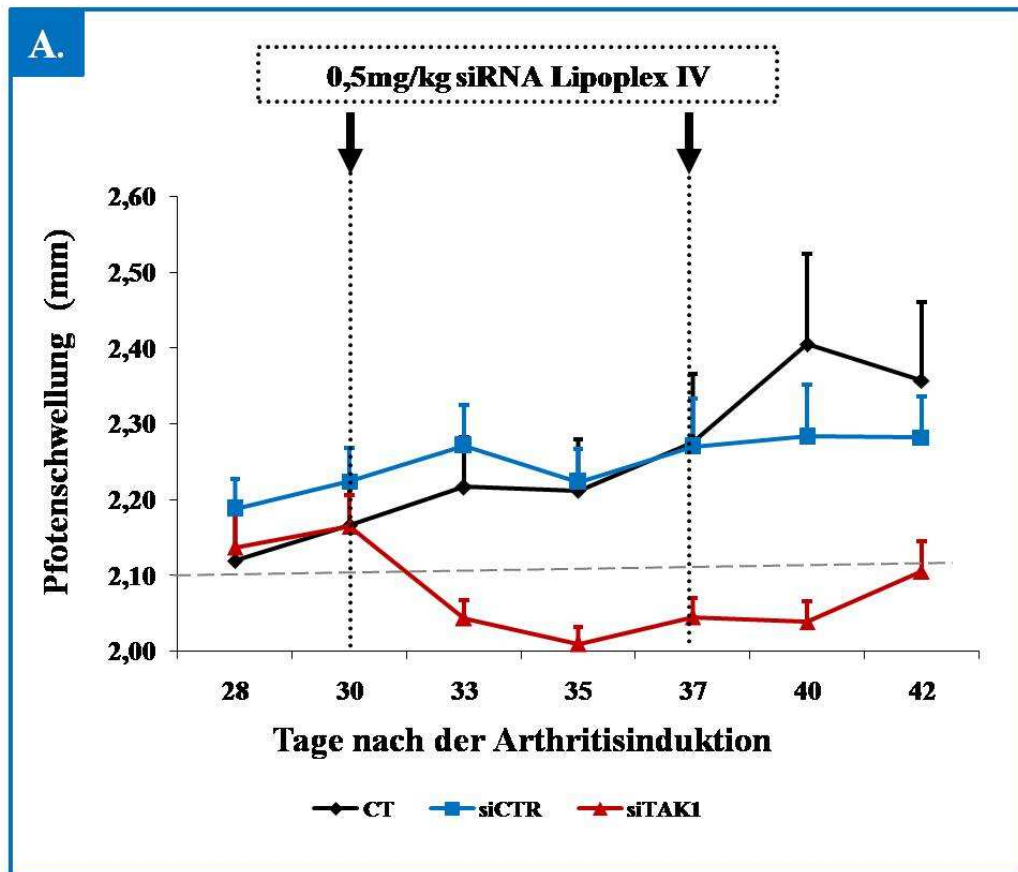


Abbildung 3-9 | *Therapeutischer Effekt einer TAK1-spezifischen siRNA-Behandlung auf die Pfortenschwellung in Kollagen-induzierter Arthritis.* In diesem Experiment wurden 10 Mäuse für jede Gruppe verwendet. Nach Immunisierung mit bovinem Kollagen Typ II und einer Re-Immunisierung drei Wochen später (Tag 21) zeigte sich die klinische Manifestation der Krankheit am Tag 28. Die erste intravenöse (IV) siRNA-Injektion erfolgte am Tag 30 und wurde eine Woche später (Tag 37) wiederholt. Die Pfortenschwellung wurde im Verlauf der Versuche dreimal wöchentlich mit einem Mikrometer gemessen. Bereits nach der ersten Applikation der siRNA gegen TAK1 zeigte sich eine deutliche Reduktion der Pfortenschwellung unter den arthritischen Schwellenwert von 2,1 mm. Dieser konnte durch die erneute Applikation am Tag 37 bis zum Tag 40 konstant gehalten werden und stieg erst gegen Ende des Experiments leicht wieder an (rote Linie). Die unbehandelten (CT) bzw. mit einer Kontroll-siRNA (siCTR) behandelten Mäuse hingegen entwickelten im Verlauf des Experiments eine starke Arthritis, was durch stetig steigende Pfortenschwellungen gekennzeichnet ist.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die siRNA-basierte Inhibierung von TAK1 den Entzündungsverlauf der Kollagen-induzierten Arthritis, gemessen an dem Grad der Pfortenschwellung, stark reduziert. Die Pfortenschwellungen der siTAK1-behandelten Mäuse sanken deutlich unter den arthritischen Schwellenwert von 2,1 mm und zeigten keine Anzeichen einer Entzündung, wohingegen die Kontrollmäuse eine starke Arthritis entwickelten.

3. Ergebnisse

Um zu zeigen, dass diese starke Reduktion der Pfortenschwellung und somit der Effekt der siTAK1-Behandlung reproduzierbar ist, wurden die Experimente wiederholt (Abbildung 3-10, S.69 und Abbildung 3-11, S.70).

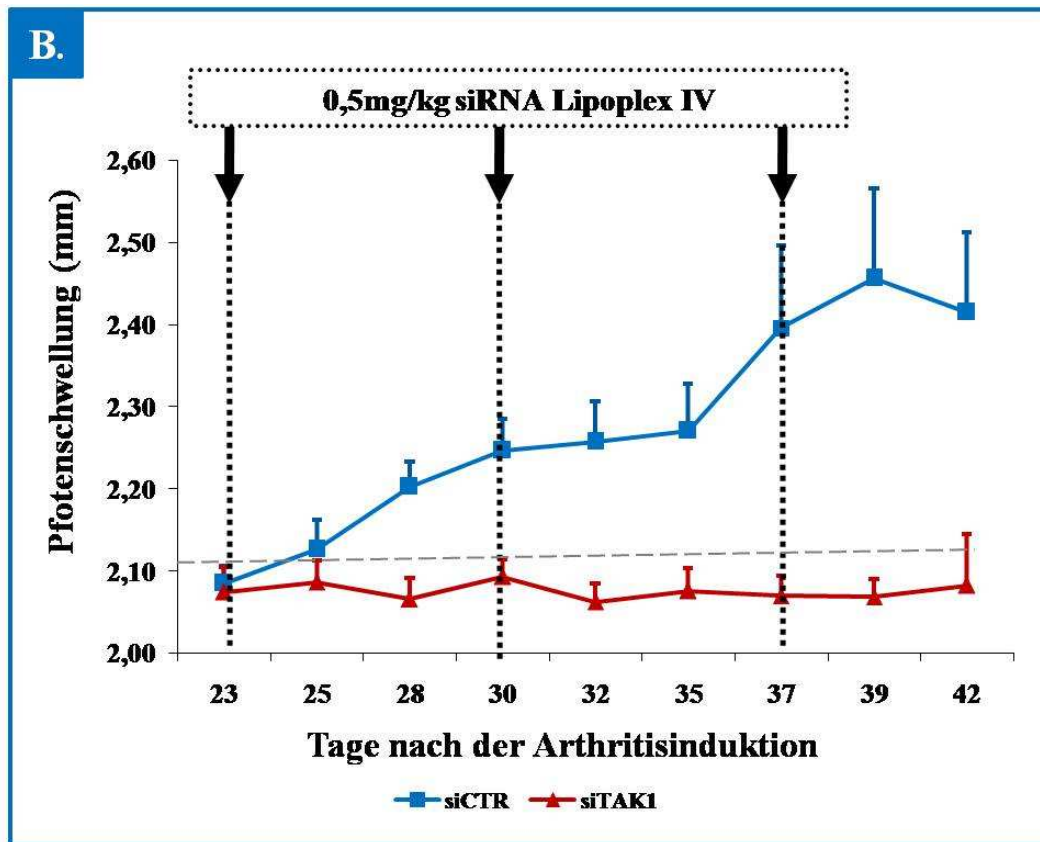


Abbildung 3-10 | *Therapeutischer Effekt einer TAK1-spezifischen siRNA-Behandlung auf die Pfortenschwellung in Kollagen-induzierter Arthritis.* In diesem Experiment wurden 7 Mäuse für die Kontrollgruppe und 8 Mäuse für die siTAK1 Gruppe verwendet. Nach Immunisierung mit bovinem Kollagen Typ II und einer erneuten Immunisierung drei Wochen später (Tag 21) erfolgte die erste intravenöse (IV) siRNA-Injektion am Tag 23 und wurde wöchentlich über einen Zeitraum von insgesamt 3 Wochen wiederholt (Tag 30 und Tag 37). Die Pfortenschwellung wurde im Verlauf des Versuchs dreimal wöchentlich mit einem Mikrometer gemessen. Durch die wiederholte siTAK1-Behandlung konnte die Pfortenschwellung in dieser Gruppe über den gesamten Verlauf des Experiments unter dem arthritischen Schwellenwert gehalten werden und blieb dabei konstant (rote Linie). Die Kontrollmäuse (siCTR) hingegen entwickelten eine starke Arthritis, gekennzeichnet durch Pfortenschwellungen von über 2,4 mm (blaue Linie).

In einem zweiten Experiment wurden 7 Mäuse als Kontrolle (siCTR) und 8 Mäuse für die Behandlung mit der siRNA gegen TAK1 verwendet. Nach Immunisierung und Re-Immunisierung 3 Wochen später (Tag 21) erfolgte die siRNA-Applikation bereits bei den ersten Anzeichen einer klinischen Manifestation am Tag 23 und wurde wöchentlich über einen Zeitraum von insgesamt 3 Wochen wiederholt. Dabei zeigte sich, dass die Pfortenschwellung der siTAK1-behandelten Mäuse über den gesamten Verlauf des Experiments konstant gehalten werden konnte und knapp unter dem arthritischen Schwellenwert von 2,1 mm lag (Abbildung 3-10, S. 69, rote Linie). Im Vergleich dazu stieg die Pfortenschwellung in der mit einer Kontroll-siRNA (siCTR, blaue Linie) behandelten Gruppe im Verlauf des Experiments stetig an und erreichte gegen Ende am Tag 42 eine Pfortenschwellung von mehr als 2,4 mm, was eine sehr stark ausgeprägte Arthritis anzeigt.

Dieses Experiment zeigt, dass der positive Einfluss der siRNA-abhängigen Inhibierung von TAK1 auf den Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis reproduzierbar ist und dass dieser Effekt durch eine wöchentliche Behandlung über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden kann.

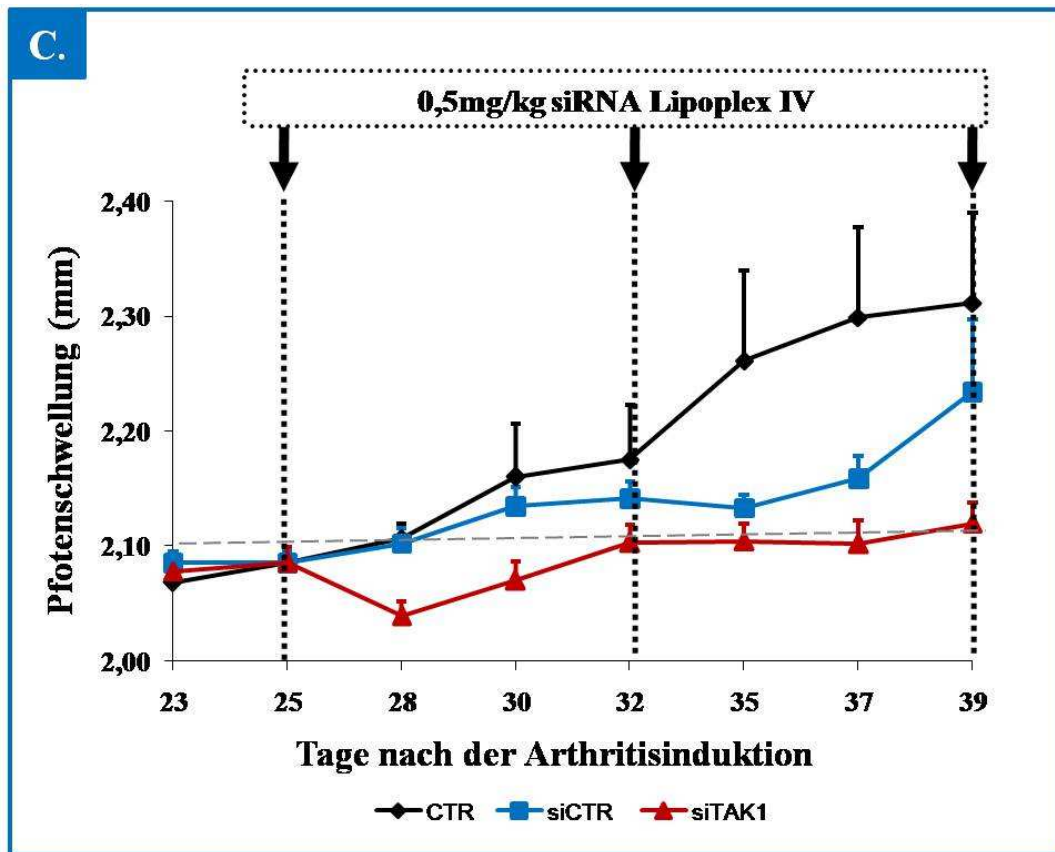


Abbildung 3-11 | *Therapeutischer Effekt einer TAK1-spezifischen siRNA-Behandlung auf die Pfortenschwellung in Kollagen-induzierter Arthritis.* In diesem Experiment wurden 10 Mäuse für jede Gruppe verwendet. Nach Immunisierung mit bovinem Kollagen Typ II und einer Re-Immunisierung drei Wochen später (Tag 21) erfolgte die erste intravenöse (IV) siRNA-Injektion am Tag 25 und wurde wöchentlich über einen Zeitraum von insgesamt 3 Wochen wiederholt (Tag 32 und Tag 39). Die Pfortenschwellung wurde im Verlauf des Versuchs dreimal wöchentlich mit einem Mikrometer gemessen. In der siTAK1-behandelten Gruppe blieb die Pfortenschwellung im Verlauf des Experiments nahezu konstant knapp unter bzw. bei 2,1 mm, was dem arthritischen Schwellenwert entspricht (rote Linie). Bei den Kontrollmäusen stieg die Pfortenschwellung deutlich im Verlauf des Experiments an und betrug 2,3 mm in den unbehandelten Kontrollmäusen (CTR, schwarze Linie) und mehr als 2,2 mm in den mit einer Kontroll-siRNA behandelten Mäusen (siCTR, blaue Linie).

Auch in einem dritten Experiment (Abbildung 3-11) zeigte sich derselbe Effekt. Hier wurden für jede Gruppe 10 Mäuse verwendet, die wiederum nach Immunisierung und Re-Immunisierung 3 Wochen später (Tag 21) über einen Zeitraum von 3 Wochen (Tag 25, 32 und 39) mit einer intravenösen Injektion einer siRNA gegen TAK1, einer Kontroll-siRNA oder nicht behandelt wurden. In der siTAK1 Gruppe sank die Pfortenschwellung nach der ersten siRNA Injektion am Tag 25 leicht ab, stieg aber im Verlauf der Woche bis zur nächsten Injektion wieder leicht an. Durch die nächsten siTAK1 Injektionen konnte die Pfortenschwellung der Mäuse konstant um den Wert 2,1 mm gehalten werden (Abbildung 3-11, S.70, rote Linie). Im Gegensatz dazu stieg die Pfortenschwellung der Kontrollmäuse wieder an und zeigten am Ende des Experiments Pfortenschwellungen von 2,3 mm bei den unbehandelten Kontrollen und mehr als 2,2 mm bei den siCTR behandelten Mäusen.

Insgesamt belegen die durchgeführten Experimente, dass die Behandlung von arthritischen Mäusen mit einer siRNA gegen TAK1 einen reproduzierbaren, therapeutischen Effekt auf den Verlauf der Arthritis und damit der Entzündungsreaktion hat. In allen Experimenten konnte die Pfotenschwellung konstant unter bzw. bei dem arthritischen Schwellenwert von 2,1 mm gehalten werden, während die Kontrollmäuse eine starke Arthritis mit Pfotenschwellungen von bis zu 2,4 mm entwickelten. Der Effekt der siTAK1-Behandlung konnte über einen Zeitraum von 3 Wochen durch eine wöchentliche siRNA-Applikation konstant gehalten werden.

Der therapeutische Effekt der siTAK1-Behandlung spiegelt sich auch in den Arthritiswerten (,arthritic score‘) wider. Hierbei wird der Schweregrad der Entzündung visuell für alle vier Pfoten nach einem weit verbreiteten Punktesystem von 0 bis 4 bestimmt (Tabelle 2-2, S.54), wobei 0 keine und 4 eine schwere Arthritis anzeigt. Für jede Maus kann also ein Maximalwert von 16 erreicht werden, wenn alle vier Pfoten von einer schweren Arthritis betroffen sind. Die Werte wurden dreimal pro Woche basierend auf Rötung und Schwellung der Gelenke bestimmt und sind in Abbildung 3-12, S.72 und Abbildung 3-13, S.73 dargestellt.

In Abbildung 3-12, S.72 sind die Arthritiswerte, zugehörig zu dem in Abbildung 3-10, S.69 gezeigten Experiment, dargestellt. Die Ausprägung der Arthritis war am Tag 21 vor Beginn der siRNA-Behandlung in der siTAK1 Gruppe höher als in der Kontrollgruppe. Nach der ersten siRNA Applikation sank der Arthritiswert in der mit einer siRNA gegen TAK1 behandelten Gruppe deutlich auf einen Wert von 2 ab (rote Linie) und konnte im gesamten Verlauf des Experiments durch wiederholte siRNA-Applikation nahezu konstant bei diesem Wert gehalten werden. Ein arthritischer Wert von 2 zeigt in der gesamten Gruppe eine sehr milde Arthritis an. Im Gegensatz dazu nahm die Entzündung bei den Kontrollmäusen stetig zu, was durch einen steigenden Arthritiswert gekennzeichnet ist. Am Ende des Experiments lag der Arthritiswert bei den Kontrollmäusen bei durchschnittlich 6 und zeigt eine stark ausgeprägte Arthritis an (blaue Linie). Insgesamt konnte der Arthritiswert in der siTAK1-behandelten Gruppe um nahezu 70% im Vergleich zu den Kontrollmäusen reduziert werden (von einem Wert von 6 bei den Kontrollen auf einen Wert von 2 bei den siTAK1-Mäusen).

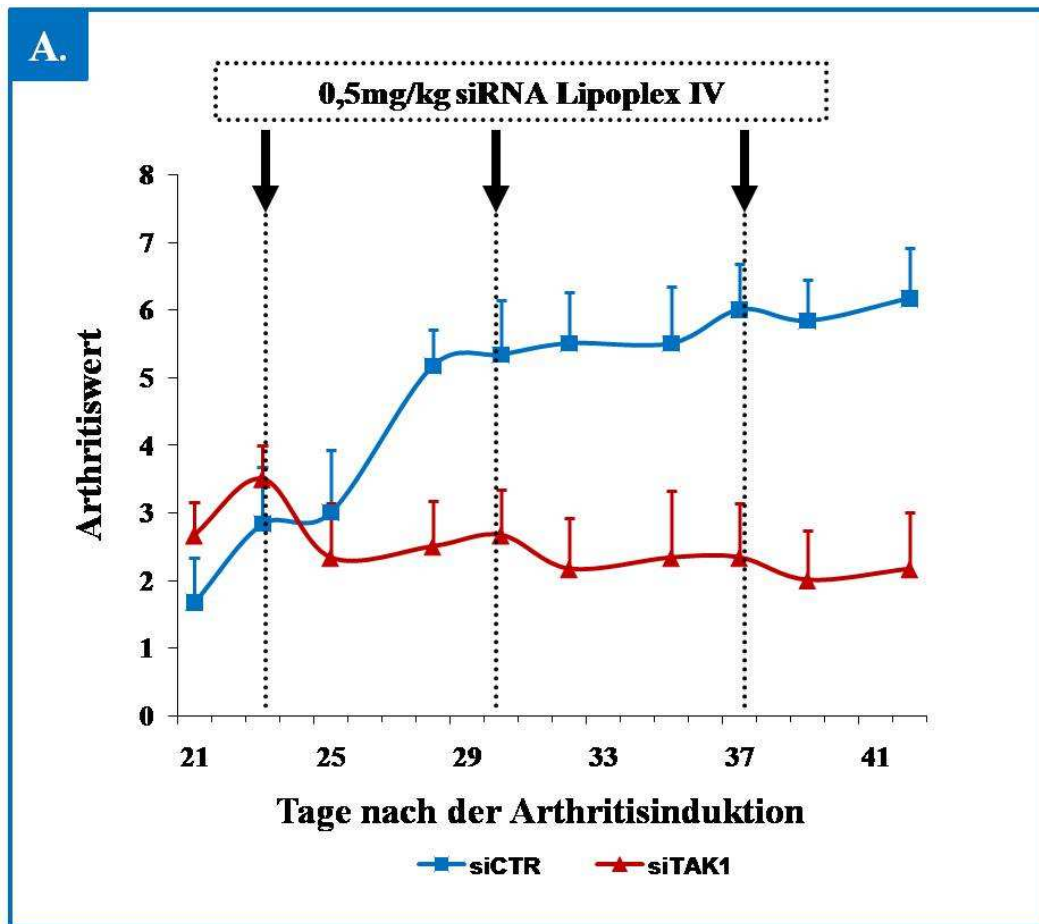


Abbildung 3-12 | *Therapeutischer Effekt einer TAK- spezifischen siRNA-Behandlung auf die Entzündung in Kollagen-induzierter Arthritis.* Die Arthritiswerte wurden dreimal pro Woche bestimmt und sind ein makroskopischer Indikator für den Schweregrad der Entzündung im Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis. Dabei werden allen vier Pfoten Werte von 0 bis 4 zugeordnet, wobei 0 keine und 4 eine schwere Arthritis basierend auf Rötung und Schwellung der Gelenke anzeigt. So kann pro Maus ein Maximalwert von 16 erreicht werden. In diesem Experiment wurden 7 (siCTR) bzw. 8 Mäuse (siTAK1) pro Gruppe verwendet. Nach der ersten siRNA Applikation am Tag 23 nach der Immunisierung sank der Arthritiswert in der siTAK1-behandelten Gruppe deutlich ab und konnte im Verlauf des Experiments konstant bei einem Wert von 2 gehalten werden, der eine milde Arthritis anzeigt. Die Kontrollmäuse hingegen entwickelten eine starke Entzündung, gekennzeichnet durch den stetig steigenden Arthritiswert, der am Ende des Experiments einen Wert von 6 erreichte und eine starke Arthritis anzeigt. In der siTAK1-Gruppe konnte der Arthritiswert durch die siRNA-Behandlung um fast 70 % gegenüber den Kontrollmäusen reduziert werden.

Dieser durch die siRNA-basierte Inhibierung von TAK1 vermittelte, positive Effekt auf die Entzündungsreaktion, der durch einen stark reduzierten Arthritiswert gekennzeichnet ist, zeigte sich ebenfalls in einem weiteren, unabhängigen Experiment. Hier wurden 10 Mäuse für jede Mausgruppe verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-13, S.73 dargestellt und basieren auf dem in Abbildung 3-11, S.70 gezeigten Versuch.

Auch hier zeigte sich eine deutliche Reduktion des Arthritiswertes nach der ersten Injektion einer siRNA gegen TAK1, der von einem Wert von 2,5 auf 1 sank, jedoch dann im Verlauf der ersten Woche nach der Injektion wieder anstieg und am Ende des Versuchs bei einem Arthritiswert von 3,5 lag. Dies zeigt eine leichte Arthritis in dieser Gruppe an. Im Gegensatz dazu konnte bei den Kontrollgruppen ein stetiger Anstieg des Arthritiswertes beobachtet werden, der am Ende bei 5 für die siCTR-Gruppe und bei 7 für die unbehandelte Kontrollgruppe lag und auf eine ausgeprägte Entzündung in diesen Mausgruppen hinweist. Damit zeigte sich

3. Ergebnisse

auch hier eine deutliche Reduktion des Arthritiswertes und damit der Entzündung in der si-TAK1-behandelten Gruppe um 40-50 % gegenüber den Kontrollen (Abbildung 3-13).

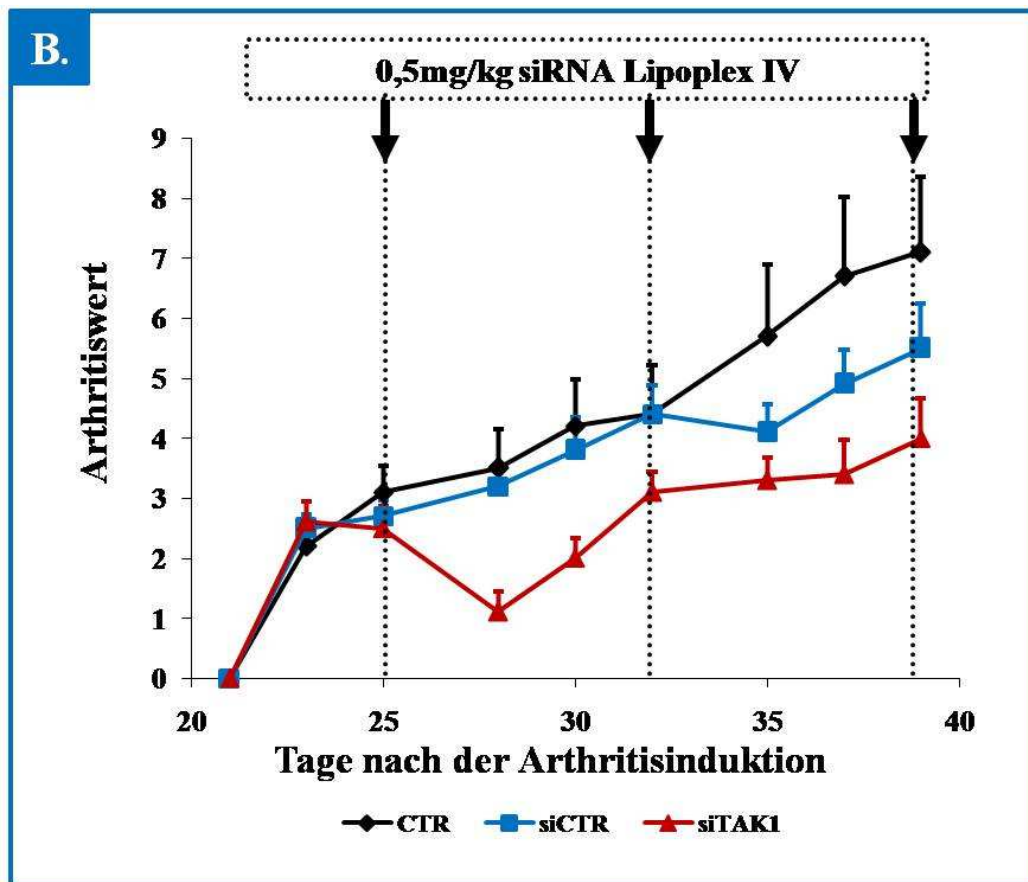


Abbildung 3-13 | *Therapeutischer Effekt einer TAK1-spezifischen siRNA-Behandlung auf die Entzündung in Kollagen-induzierter Arthritis.* Die Arthritiswerte wurden dreimal pro Woche bestimmt und sind ein makroskopischer Indikator für den Schweregrad der Entzündung im Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis. Dabei werden allen vier Pfoten Werte von 0 bis 4 zugeordnet, wobei 0 keine und 4 eine schwere Arthritis basierend auf Rötung und Schwellung der Gelenke anzeigt. So kann pro Maus ein Maximalwert von 16 erreicht werden. Jede Gruppe bestand aus 10 Mäusen. In der siTAK1-Gruppe zeigt sich nach der ersten Injektion am Tag 25 eine deutliche Reduktion des Arthritiswertes auf 1, der dann aber wieder anstieg und durch erneute Injektionen bei einem Wert von 3,5 am Ende des Experiments lag, was eine leichte Arthritis in der Gruppe anzeigt. Im Vergleich dazu stiegen die Arthritiswerte in den Kontrollgruppen stetig im Verlauf des Versuchs an und zeigten am Ende des Experiments Werte von 5 (siCTR, blaue Linie) und 7 (CTR, schwarze Linie). Insgesamt konnte durch die siTAK1-Behandlung der Arthritiswert in dieser Gruppe um 40-50 % gegenüber den Kontrollen reduziert werden.

Insgesamt konnte durch die Untersuchung der Arthritiswerte in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt werden, dass die Behandlung mit einer siRNA gegen TAK1 die Arthritiswerte und damit die Entzündung in den Gelenken deutlich gegenüber den Kontrollmäusen reduziert werden konnte. Dabei zeigte sich eine Verminderung der Arthritiswerte um 40-50 % (Abbildung 3-13) und 70 % (Abbildung 3-12).

Als nächstes wurde basierend auf den Pfotenschwellungen die Inzidenz, also die Häufigkeit von Arthritis, im Verlauf der Experimente bestimmt. Dabei gilt eine Maus als arthritisch, wenn sie eine Pfotenschwellung von mehr als 2,1 mm aufweist. Die Ergebnisse von zwei voneinander unabhängigen Versuchen (A und B) sind in Abbildung 3-14, S.74 dargestellt.

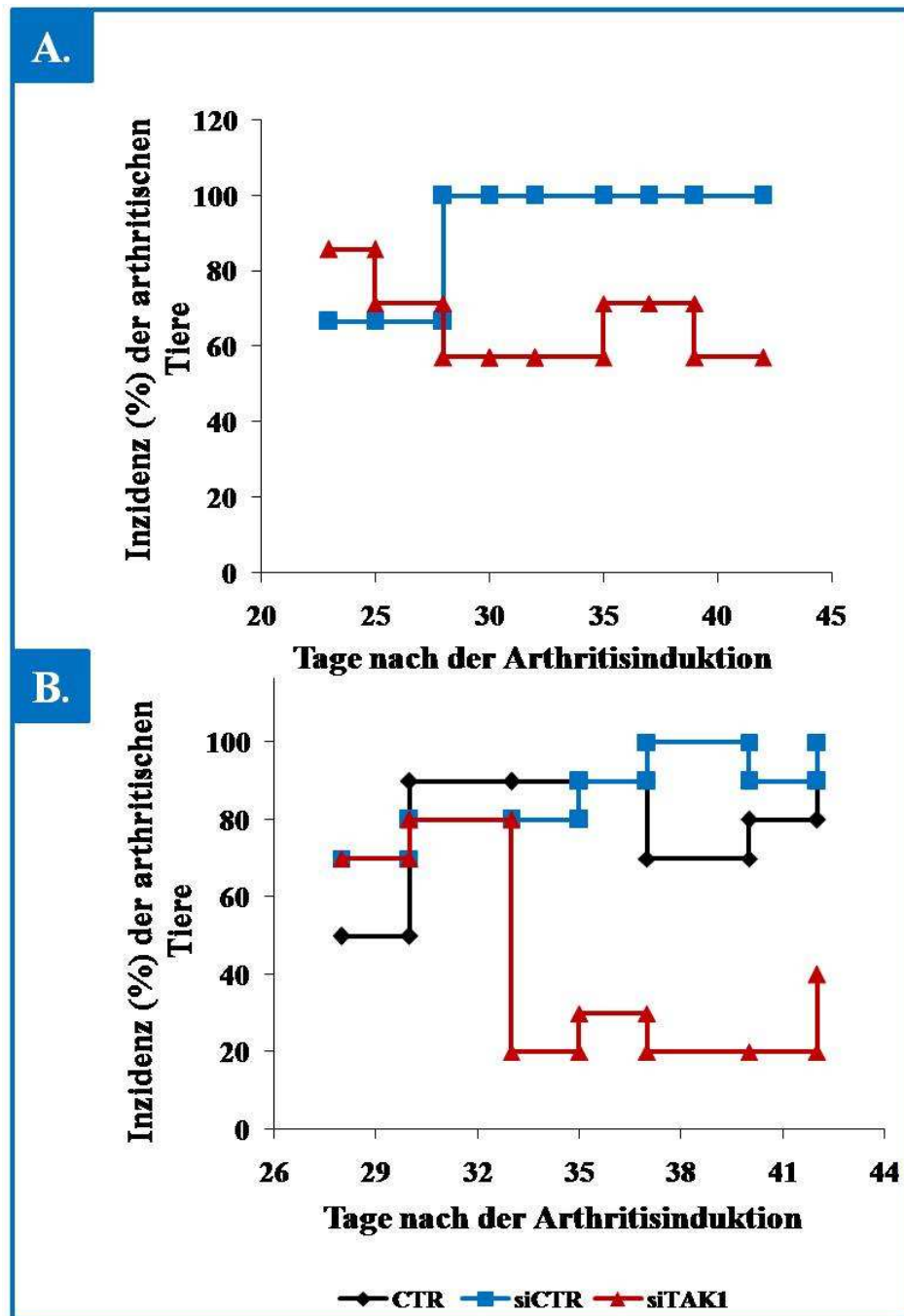


Abbildung 3-14 | Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die Häufigkeit (Inzidenz) von Kollagen-induzierter Arthritis. Darstellung der Inzidenz in zwei voneinander unabhängigen Experimenten (A und B). Im ersten Versuch (A) wurden 7 Mäuse für die siCTR- und 8 Mäuse für die siTAK1-Gruppe verwendet. Im zweiten Versuch (B) bestanden die Gruppen aus jeweils 10 Mäusen. Es zeigte sich in beiden Versuchen (A und B), dass eine Behandlung mit einer siRNA gegen TAK1 zu einer deutlich verminderten Häufigkeit von Kollagen-induzierter Arthritis in dieser Gruppe führte. Dabei konnte im Vergleich zu den Kontrollmäusen, die zu 90-100 % arthritisch waren (A. und B.), die Inzidenz in den siTAK1-Mäusen um 40 % (A.) bis 60 % (B.) reduziert werden.

Es zeigte sich, dass die verminderte Entzündungsreaktion, gekennzeichnet durch reduzierte Pfotenschwellungen und Arthritiswerte in den mit einer siRNA gegen TAK1-behandelten Mausgruppen, zu einer Senkung der Arthritishäufigkeit in diesen Mäusen führte (Abbildung 3-14, S.74). Dabei zeigte sich in beiden Experimenten bereits nach der ersten siTAK1-Behandlung (Tag 23, A; Tag 30, B) eine deutliche Senkung der Arthritishäufigkeit in dieser Gruppe. Diese konnte durch erneute siTAK1-Behandlungen über den Verlauf der Experimen-

te annähernd konstant gehalten werden (rote Linie, A und B) und lag am Ende bei 60 % (A) bzw. 40 % (B). Im Vergleich zu den Kontrollmäusen, die am Ende der Experimente zu 90 bis 100 % arthritisch waren, konnte die Inzidenz in den siTAK1 behandelten Mäusen also um 40 % (A) bis 60 % (B) reduziert werden.

Insgesamt zeigen die Versuche, dass eine *in vivo*-Behandlung von arthritischen Mäusen mit einer siRNA gegen TAK1 einen deutlichen therapeutischen Effekt auf Verlauf und Schweregrad der Arthritis hat. Dabei konnten die Pfotenschwellungen unter das Arthritisniveau von 2,1 mm gesenkt werden, während die Kontrollmäuse eine starke Arthritis, gekennzeichnet durch Pfotenschwellungen von bis zu 2,4 mm, entwickelten. Der Arthritiswert, ein Indikator für den Schweregrad der Entzündung, konnte in den siTAK1-behandelten Mäusen um bis zu 70 % gegenüber den Kontrollmäusen gesenkt werden. Die Häufigkeit von Arthritis nahm, wie aufgrund der Ergebnisse zu erwarten war, in der siTAK1 Gruppe um 40-60 % ab. Diese Ergebnisse bestätigen die eingangs formulierte Hypothese, dass eine Inhibierung von TAK1 zu einer verminderten inflammatorischen Reaktion in der rheumatoiden Arthritis führen sollte.

3.2.3 Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf das Th1/Th2-Gleichgewicht und die T-Zellproliferation in Kollagen-induzierter Arthritis

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Inhibierung von TAK1 den Schweregrad und die Häufigkeit von Kollagen-induzierter Arthritis deutlich vermindert, stellte sich als nächstes die Frage nach den zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen.

Auf zellulärer Ebene sind neben den Makrophagen die T-Zellen von Bedeutung in Entstehung und Erhalt der Entzündung in der rheumatoiden Arthritis. T-Helferzellen spielen eine besondere Rolle, da es nach der Injektion von Kollagen II zu einer Aktivierung und Expansion von Antigen-spezifischen T-Helferzellen kommt, die den Th1-Phänotyp aufweisen und die Immunantwort initiieren (Fournier, 2005; Doncarli, et al., 1997). T-Helferzellen werden aufgrund ihres spezifischen Zytokinprofils in Th1- und Th2-Zellen eingeteilt, wobei Th1-Zellen durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN γ und TNF α die Entzündungsreaktion vorantreiben, während Th2-Zellen durch die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 dem Entzündungsprozess entgegenwirken. Durch die in der Kollagen-induzierten Arthritis begünstigte Expansion von Th1-Zellen kommt es zu einem Ungleichgewicht von Th1- gegenüber Th2-Zellen, was als mögliche Ursache für viele Autoimmunerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis angesehen wird.

Die Kollagen-induzierte Arthritis ist also eine durch Th1-Zellen vermittelte Erkrankung (Schultze-Koops, et al., 2001; Steinmann, 2007) und es stellte sich die Frage, inwiefern die Inhibition von TAK1 durch die siRNA-Behandlung einen Einfluss auf die Proliferation und Aktivierung der T-Helferzellpopulationen hat. Dazu wurde die Produktion von Antikörpern gegen bovines Kollagen II im Serum bestimmt, da diese mit der Anfälligkeit für Kollagen-induzierte Arthritis korrelieren und durch ein hohes Verhältnis von Immunglobulin-2a (IgG2a) zu Immunglobulin-1 (IgG1) charakterisiert werden. Dabei korreliert die Produktion von IgG2a Antikörpern mit einer Th1-induzierenden Aktivität, während IgG1-Antikörper mit einer Th2-induzierenden Aktivität gleichgesetzt werden können. Um so einen möglichen Einfluss der Inhibierung von TAK1 durch die siRNA-Behandlung auf das Th1/Th2-

3. Ergebnisse

Gleichgewicht zu ermitteln, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Experimente die Serummengen von bovinem Kollagen II spezifischem IgG1 und IgG2a gemessen und das Verhältnis von IgG2a zu IgG1 bestimmt (Abbildung 3-15, S.76).

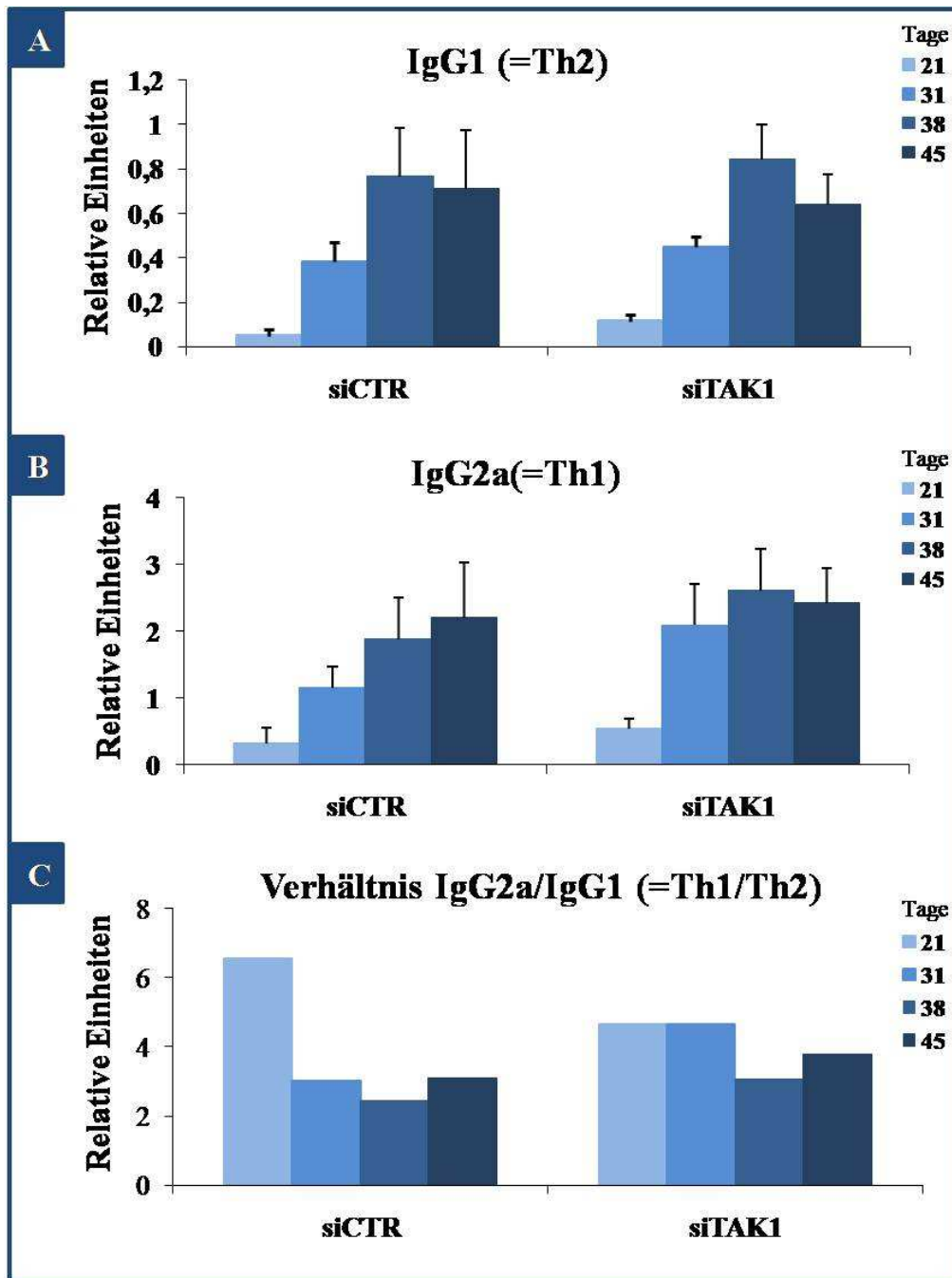


Abbildung 3-15 | Einfluss der siTAK1-Behandlung auf das IgG2a/IgG1-Verhältnis im Verlauf der Arthritis. Die Produktion von IgG1 (A) und IgG2a (B) korreliert mit der Aktivität von Th2- bzw. Th1-Zellen. Im Verlauf des Experiments wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die IgG1- und IgG2a-Konzentrationen in den Seren der Mäuse bestimmt (A und B) und zueinander ins Verhältnis gesetzt (C). Wie zu erwarten, stieg die Produktion von IgG1 als auch IgG2a nach Induktion der Krankheit an (A und B). Im Verhältnis von IgG2a zu IgG1 (C) zeigten sich konstant hohe Werte, was bezogen auf die Aktivität der T-Helferzellen eine erhöhte Th1-Aktivität gegenüber der Th2-Aktivität angibt. Dabei waren keine maßgeblichen Unterschiede zwischen den siCTR- und siTAK1-behandelten Gruppen feststellbar.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-15 dargestellt und zeigen wie erwartet, dass die Werte für die IgG1- und IgG2-Antikörper nach der Induktion der Arthritis deutlich ansteigen (A. und

B.), was mit einer gesteigerten Th1- und Th2-Aktivität einhergeht. Die Verhältnisse von IgG2a zu IgG1 zeigen sowohl bei den Kontrollen als auch bei den siTAK1-behandelten Mäusen konstant hohe Werte (C.). Dabei ist das Verhältnis von IgG2a zu IgG1 am Tag 21 in den siTAK1-behandelten Mäusen deutlich geringer als in den Kontrollen, was auf eine erhöhte Anwesenheit von Th2-Zellen in der siTAK1-Gruppe zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollen zurückzuführen ist. Dies ist jedoch aufgrund der insgesamt geringen Mengen von IgG2a (Th1, B) und IgG1 (Th2, A) zu diesem Zeitpunkt nicht von maßgeblicher Bedeutung und vernachlässigbar (Abbildung 3-15, S.76).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Inhibition von TAK1 durch die siRNA-Applikation das Verhältnis von IgG2a zu IgG1 im Verlauf der Arthritis im Vergleich zu den Kontrollen nicht vermindert. In Korrelation mit der Aktivität der T-Helferzellen bedeutet dies, dass die Aktivität von Th1-Zellen im Verlauf der Experimente deutlich höher ist als die Aktivität der Th2-Zellen und dass somit der positive Einfluss der TAK1 siRNA-Behandlung nicht auf eine Veränderung des Th1/Th2-Gleichgewichts zugunsten der Aktivität von Th2-Zellen zurückzuführen ist.

Neben der Bestimmung der Kollagen II spezifischen Antikörperproduktion im Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis wurde untersucht, ob die Inhibierung der TAK1-Expression durch die siRNA-Applikation einen Einfluss auf die Kollagen II spezifische Proliferation von T-Zellen hat. Dazu wurden Zellen aus der Milz isoliert und mit Concanavalin A (Con A, 2 µg/ml) oder verschiedenen Kollagen II Konzentrationen (0, 5, 10 und 50 µg/ml) inkubiert. Concanavalin A dient dabei als Positivkontrolle für die Vitalität der T-Zellen in Milz und Lymphknoten, da es in der Lage ist, T-Zellen, wahrscheinlich über den CD3-Komplex, zu stimulieren und damit zur Proliferation anzuregen. Die Immunantwort auf Concanavalin A sollte in allen isolierten Zellen gleich sein. Weiterhin soll durch die verschiedenen Kollagen II Konzentrationen getestet werden, ob durch die Anwesenheit von Kollagen II die T-Zellen aktiviert und damit zur Proliferation angeregt werden können. Diese sollte mit steigenden Konzentrationen an Kollagen II ebenfalls zunehmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-16, S.78 dargestellt.

In Anwesenheit von Concanavalin A (Abbildung 3-16, B) zeigen die aus der Milz gewonnenen Zellen eine gleichmäßig hohe Proliferationsaktivität. Dabei ist kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den siTAK1-behandelten Mausgruppen festzustellen. Dies zeigt, dass die durch einen unspezifischen Stimulus ausgelöste Proliferationsfähigkeit der T-Zellen nicht durch die Inhibierung von TAK1 beeinträchtigt wird.

Die Proliferation der T-Zellen aus der Milz wird ebenfalls durch einen spezifischen Stimulus in Form von bovinem Kollagen II angeregt und nimmt entsprechend den Erwartungen mit steigenden Kollagen II Konzentrationen zu (Abbildung 3-16, A). Dabei hat die Behandlung mit einer siRNA gegen TAK1 keinen Einfluss auf die Kollagen II spezifische Proliferation der T-Zellen in der Milz. Die gleichen Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung der Proliferation von T-Zellen aus den Lymphknoten. Auch hier konnte kein Einfluss der siRNA-abhängigen TAK1 Inhibition auf die unspezifische, Concanavalin A induzierte sowie die spe-

3. Ergebnisse

zifische, Kollagen-II abhängige Proliferation der T-Zellen festgestellt werden (nicht dargestellt).

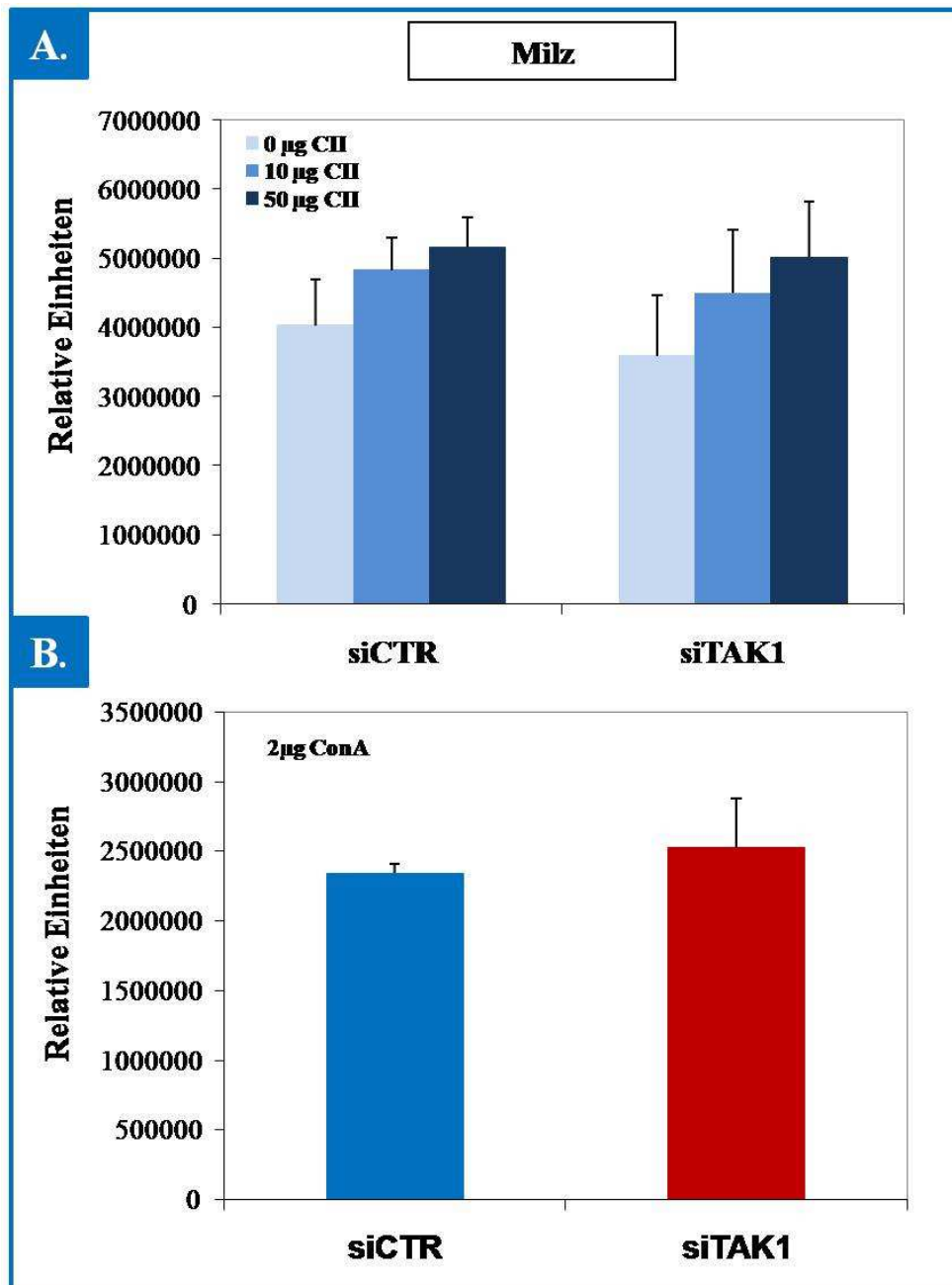


Abbildung 3-16 | Einfluss der Inhibition von TAK1 auf die Kollagen II spezifische T-Zell-Proliferation in Kollagen-induzierter Arthritis. Zellen aus der Milz wurden nach der Isolation mit Concanavalin A (ConA, 2 µg) oder zunehmenden Kollagen II Konzentrationen (0-50 µg) stimuliert, um die Stimulus-abhängige Proliferationsfähigkeit der T-Zellen zu untersuchen. Dabei weisen die T-Zellen eine gleichmäßige Proliferation nach unspezifischer Stimulation mit Concanavalin A (B) und eine konzentrationsabhängige Proliferation bei Kollagen II spezifischer Stimulation (A) auf. Die Inhibition von TAK1 hat dabei keinen Einfluss auf die Kollagen II abhängige Proliferation der T-Zellen aus der Milz.

Diese Ergebnisse sind repräsentativ für alle durchgeführten Experimente und zeigen, dass der beobachtete positive Effekt der Inhibition von TAK1 auf die Entzündung und den Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis weder auf eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts noch auf eine Veränderung der T-Zellproliferation zurückzuführen ist.

3.2.4 Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die T-Zellantwort bei Kollagen-induzierter Arthritis

Da, wie bereits erwähnt, die Kollagen-induzierte Arthritis eine Th1-vermittelte Autoimmunerkrankung ist, die durch Agenzien, die die Effektorzytokine der Th1-Zellen blockieren, gemildert werden kann, wurde der Effekt der siTAK1-Behandlung auf die T-Zellantwort untersucht. Im Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis kommt es zur Entwicklung von Effektor-T-Zellen, die hohe Mengen an IFN γ produzieren. Um den Verlauf der IFN γ -Produktion während des Experimentes zu untersuchen, wurden einmal pro Woche Blutproben von den Mäusen genommen und die Seren anschließend mittels ELISA getestet (Abbildung 3-17). Nach Einsatz der klinischen Manifestation der Arthritis beginnt die IFN γ -Produktion am Tag 31 anzusteigen. Während in den siCTR-Mäusen die IFN γ -Mengen weiter ansteigen und am Ende des Experiments einen Maximalwert von mehr als 50 pg/ml aufweisen, zeigen die siTAK1-behandelten Mäuse ein konstant niedriges IFN γ -Niveau, das im Verlauf des Experiments bei etwa 15 pg/ml liegt.

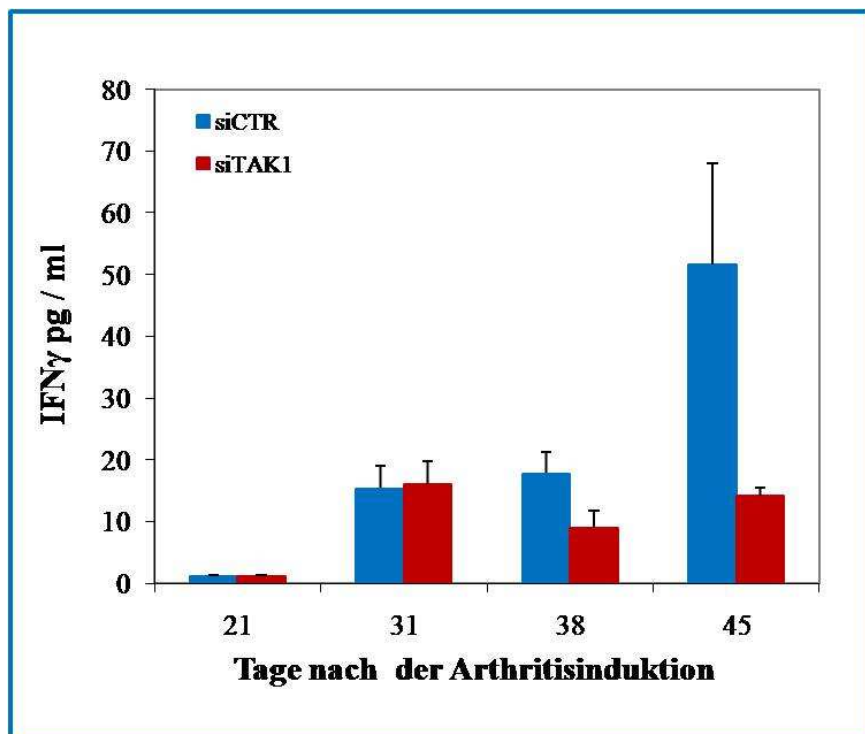


Abbildung 3-17 | Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die T-Zellantwort in Kollagen-induzierter Arthritis. Im Verlauf des Experimentes wurden den Mäusen einmal pro Woche Blutproben entnommen. Die Seren wurden anschließend auf die Produktion von IFN γ mittels ELISA getestet, um den Verlauf der Th1-Antwort zu untersuchen. In den siCTR-behandelten Mäusen (blau) steigt die IFN γ -Produktion im Verlauf des Experimentes stark an, während die siTAK1-behandelten Mäuse (rot) geringe IFN γ -Mengen im Serum über den gesamten Zeitraum des Experimentes aufweisen.

Die Inhibierung von TAK1 reduziert also die Produktion von IFN γ im Serum siTAK1-behandelter Mäuse im Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis beträchtlich, was auf eine verminderte Th1-Antwort zurückzuführen sein könnte, obwohl die Proliferation der T-Zellen und das Verhältnis von Th1- und Th2-Zellen nicht durch die siTAK1-Behandlung beeinflusst wird.

3.2.5 Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die lokale und systemische Zytokinexpression bei Kollagen-induzierter Arthritis

Die lokale und systemische Produktion von Zytokinen spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion sowie der Induktion der Gelenkdegradation in der rheumatoiden Arthritis. Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit einer TAK1-siRNA einen Einfluss auf die lokale und systemische Produktion verschiedener pro- und anti-inflammatorischer Zytokine hat, wurde die Proteinsekretion in Serum, in den die Knie umgebenden Medien und in verschiedenen Organen der behandelten Mäuse mittels ELISA gemessen.

3.2.5.1 Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die Zytokinexpression

Für die Analyse der Zytokinproduktion in verschiedenen Organen wurden Milz, Leber, Gelenke und Lymphknoten nach der Euthanasie entnommen, die Zellen isoliert und kultiviert. In den Zellüberständen wurde dann die Produktion verschiedener Zytokine mittels ELISA bestimmt. Hierbei wurde die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17 und IFN γ sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 untersucht und zusätzlich mit Serum verglichen. Die Ergebnisse für TNF α , IFN γ , IL-6 und IL-10 sind in Abbildung 3-18 bis Abbildung 3-21 für die siCTR- und siTAK1-behandelten Mausgruppen dargestellt. IL-1 β und IL-17 waren entweder nicht nachweisbar oder zeigten keine Unterschiede in den untersuchten Gruppen.

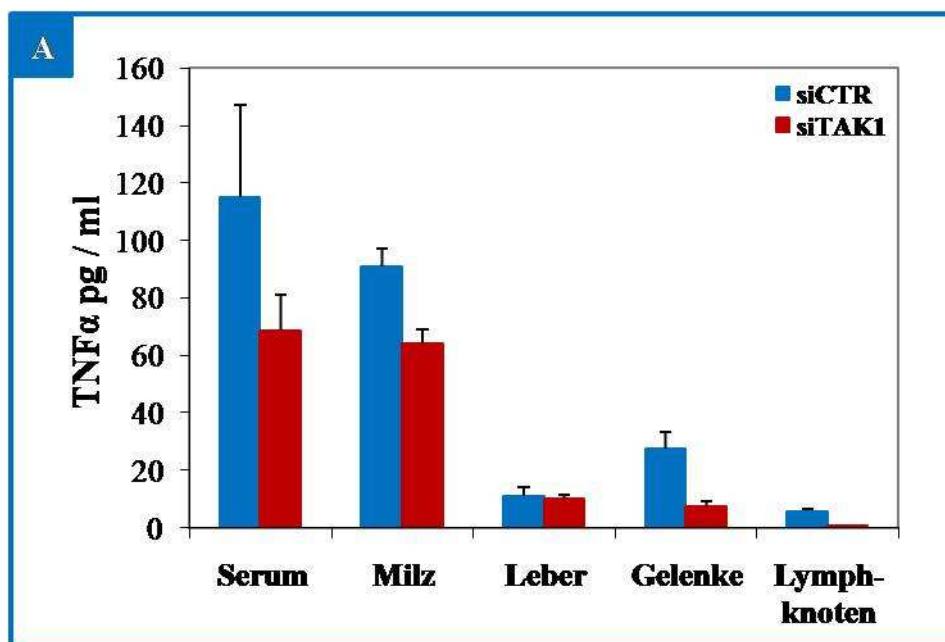


Abbildung 3-18 | Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die TNF α -Produktion in verschiedenen Organen von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis. Die Inhibierung von TAK1 führt im Vergleich zu den Kontrollmäusen (siCTR) zu einer verminderten TNF α -Produktion im Serum, der Milz und den Gelenken. Ebenfalls ist die TNF α -Produktion in den Lymphknoten in der siTAK1-Gruppe leicht reduziert. In der Leber konnte kein Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die TNF α -Produktion festgestellt werden.

TNF α ist ein Schlüsselzytokin bei der Entstehung und Erhaltung der rheumatoiden Arthritis, und viele derzeitige Therapien basieren auf der Blockierung von TNF α . Durch die Behandlung arthritischer Mäuse mit einer TAK1-siRNA konnte die Produktion von TNF α in Blut,

Milz und den Gelenken im Vergleich zu siCTR-behandelten Kontrollmäusen deutlich reduziert werden. Die Produktion von TNF α in Leber und Lymphknoten war relativ gering und es zeigte sich eine leichte Reduktion der TNF α -Produktion in der siTAK1-Gruppe in den Lymphknoten, nicht jedoch in der Leber (Abbildung 3-18, A).

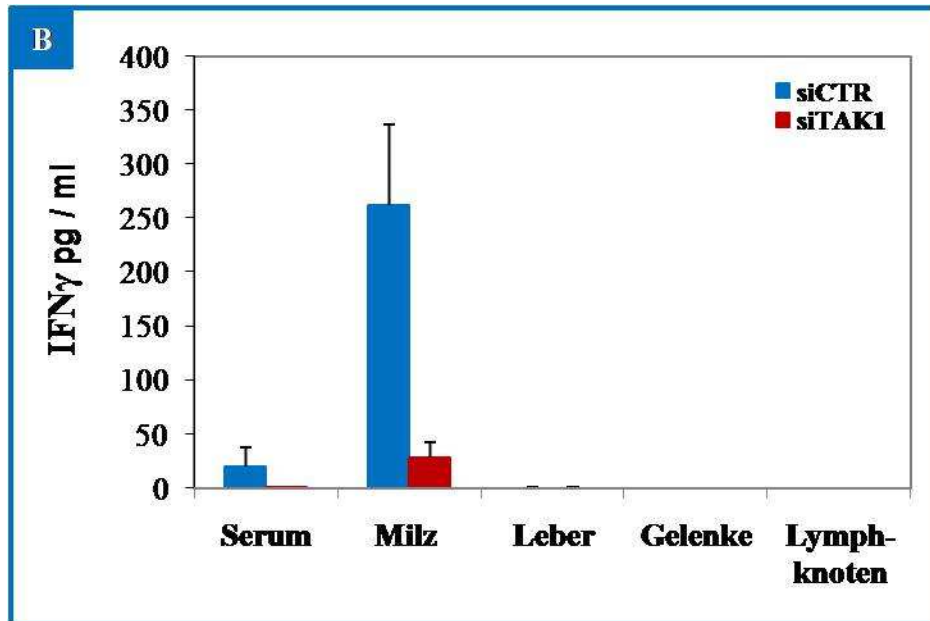


Abbildung 3-19 | Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die IFN γ -Produktion in verschiedenen Organen von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis. Die Inhibierung von TAK1 führt im Vergleich zu den Kontrollmäusen (siCTR) zu einer drastischen Reduktion der IFN γ -Produktion in der Milz. Weiterhin zeigt sich eine geringfügige Reduktion von IFN γ im Serum in den siTAK1-Mäusen, wobei hier die IFN γ -Produktion auch in den siCTR-Mäusen insgesamt nicht sehr hoch ist. In der Leber, den Gelenken und den Lymphknoten konnte weder bei siCTR noch in den siTAK-Mäusen eine Produktion von IFN γ nachgewiesen werden.

IFN γ wird von Th1-Zellen produziert und fördert deren Proliferation, während es die Differenzierung und Proliferation von Th2-Zellen verhindert. Weiterhin spielt es eine Rolle in der Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten. Beim Nachweis von IFN γ in den verschiedenen Organen von siCTR-behandelten Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis zeigte sich, dass IFN γ in hohem Maße in der Milz produziert wird, während es im Blut nur geringfügig und in den anderen untersuchten Organen, wie Lymphknoten, Leber und den Gelenken gar nicht nachweisbar war. In den Mäusen, die mit einer siRNA gegen TAK1 behandelt wurden zeigte sich eine drastische Reduktion der IFN γ -Produktion in der Milz (Abbildung 3-19, B). Die Inhibierung von TAK1 verhindert also in großem Maß die IFN γ -Produktion in der Milz arthritischer Mäuse. Da sich jedoch die Th1-Zellzahl in der Milz durch die TAK1 Inhibierung nicht ändert (vgl. 3.2.3, S.75), kann daraus geschlossen werden, dass die IFN γ -Produktion in T-Zellen TAK1-abhängig erfolgt.

IL-6 ist ebenfalls ein wichtiges Effektorzytokin, das sowohl mit lokalen als auch systemischen Symptomen der rheumatoiden Arthritis assoziiert ist. Es trägt in Tiermodellen wie der Kollagen-induzierten Arthritis zur Induktion der Krankheit bei und eine Inhibierung von IL-6 führt zur Reduktion der Aktivität und der Symptome der rheumatoiden Arthritis. In den verschiedenen untersuchten Organen von siCTR-Mäusen konnte eine starke Produktion von IL-6 im Blut, der Milz und den Gelenken nachgewiesen werden, wohingegen die Produktion in den Lymphknoten kaum nachweisbar war. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Effekt in den

3. Ergebnisse

siTAK1 behandelten Mäusen auf die IL-6-Produktion in den verschiedenen Organen. So wurde durch die Inhibierung von TAK1 die IL-6-Produktion in Blut und Milz deutlich und in den Gelenken sogar sehr stark reduziert (Abbildung 3-20, S.82).

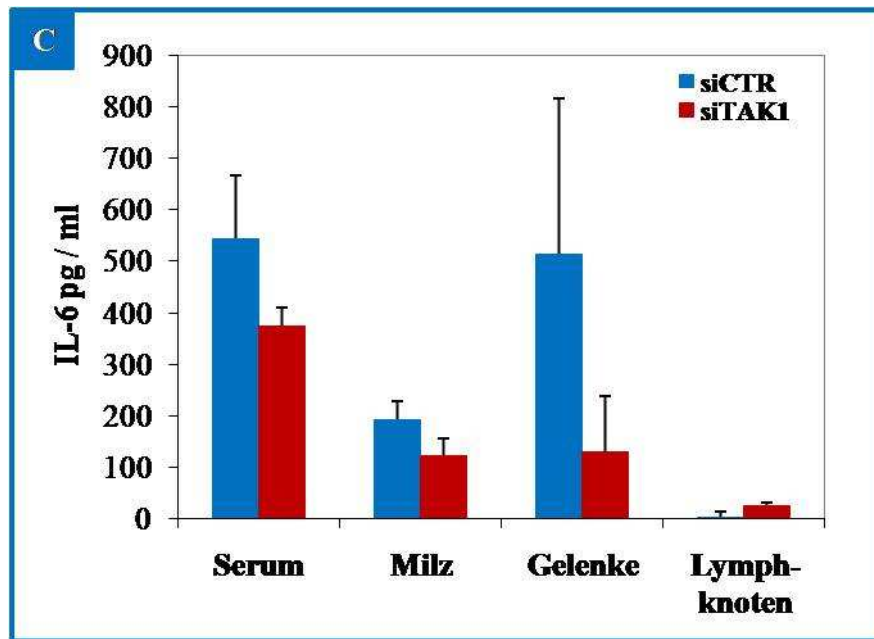


Abbildung 3-20 | Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die IL-6-Produktion in verschiedenen Organen von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis. Die Inhibierung von TAK1 führt im Vergleich zu den Kontrollmäusen (siCTR) zu einer Verminderung der IL-6-Produktion im Serum, der Milz und den Gelenken. In den Lymphknoten der siCTR-Mäuse kann die Produktion von IL-6 kaum nachgewiesen werden und ist im Vergleich dazu in den siTAK1-Mäusen vernachlässigbar höher.

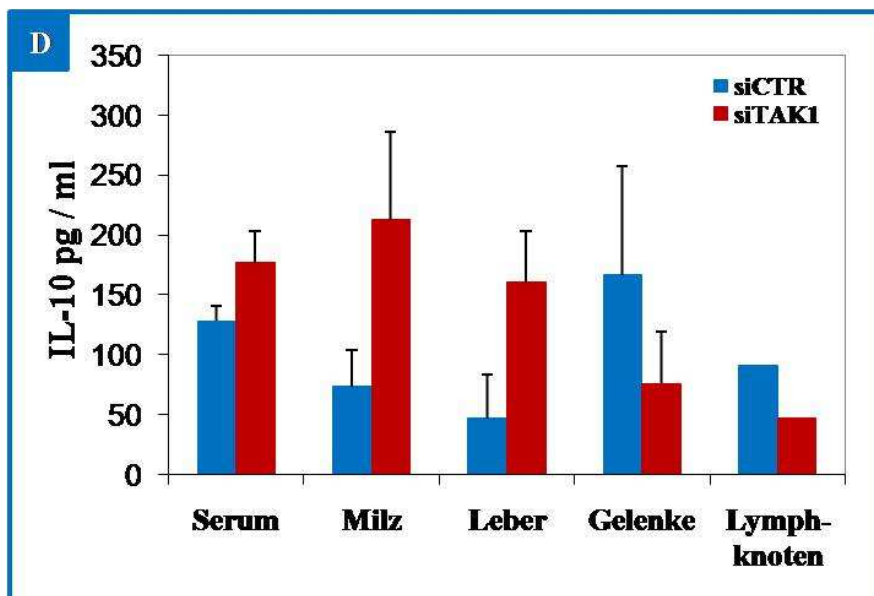


Abbildung 3-21 | Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die IL10-Produktion in verschiedenen Organen von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis. Die Inhibierung von TAK1 führt im Vergleich zu den Kontrollmäusen (siCTR) zu einer verstärkten IL-10-Produktion im Serum, der Milz und in der Leber. In den Gelenken und den Lymphknoten hingegen ist die IL-10-Produktion in der siTAK1-behandelten Gruppe gegenüber den Kontrollmäusen reduziert.

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das von Monozyten und Th2-Zellen produziert wird und unter anderem die Produktion von Th1-abhängigen Zytokinen hemmt. Eine Produk-

tion von IL-10 konnte im Serum, der Milz, der Leber, den Lymphknoten und den Gelenken der Mäuse mit Kollagen-induzierter Arthritis nachgewiesen werden. Die Produktion wurde deutlich durch die Behandlung der Mäuse mit einer siRNA gegen TAK1 in Serum, Milz und Leber gegenüber den siCTR-behandelten Mäusen verstärkt. In den Gelenken und den Lymphknoten hingegen zeigte sich eine Inhibierung der IL-10-Produktion in der siTAK1-behandelten Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 3-21, S.82, D).

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibierung von TAK1 durch die siRNA-Behandlung deutlich die Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN γ , TNF α und IL-6 in verschiedenen Organen der arthritischen Mäuse reduziert bei gleichzeitiger Verstärkung der Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Blut, Milz und Leber.

3.2.5.2 Einfluss der Inhibition von TAK1 auf die lokale Zytokinproduktion

Um den Einfluss der Inhibition von TAK1 auf die lokale Entzündung zu untersuchen, wurde die Sekretion verschiedener Zytokine in Knie-umgebendes Medium untersucht. In Abbildung 3-22, S.84 sind die Ergebnisse für TNF α , IL-1 β und IL-6 in zwei voneinander unabhängigen Experimenten (A und B) dargestellt. Andere Zytokine wie IL-10, IL-17 und IFN γ waren nicht nachweisbar und sind nicht dargestellt.

Die Sekretion von TNF α und IL-1 in das Knie umgebende Medium ist in allen untersuchten Mausgruppen gleich stark und wird durch die Inhibierung von TAK1 nicht beeinflusst (Abbildung 3-22, oberes und mittleres Diagramm). Die Sekretion von IL-6 hingegen ist im Vergleich zu den Kontrollgruppen in den siTAK1-behandelten Mäusen deutlich reduziert (Abbildung 3-22, unten). Der lokale Einfluss der TAK1-siRNA auf die Entzündung drückt sich also hauptsächlich in einer Reduktion der IL-6-Sekretion aus. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor gezeigte Verminderung der IL-6-Produktion in den Gelenken (vgl. Abbildung 3-20, S.82).

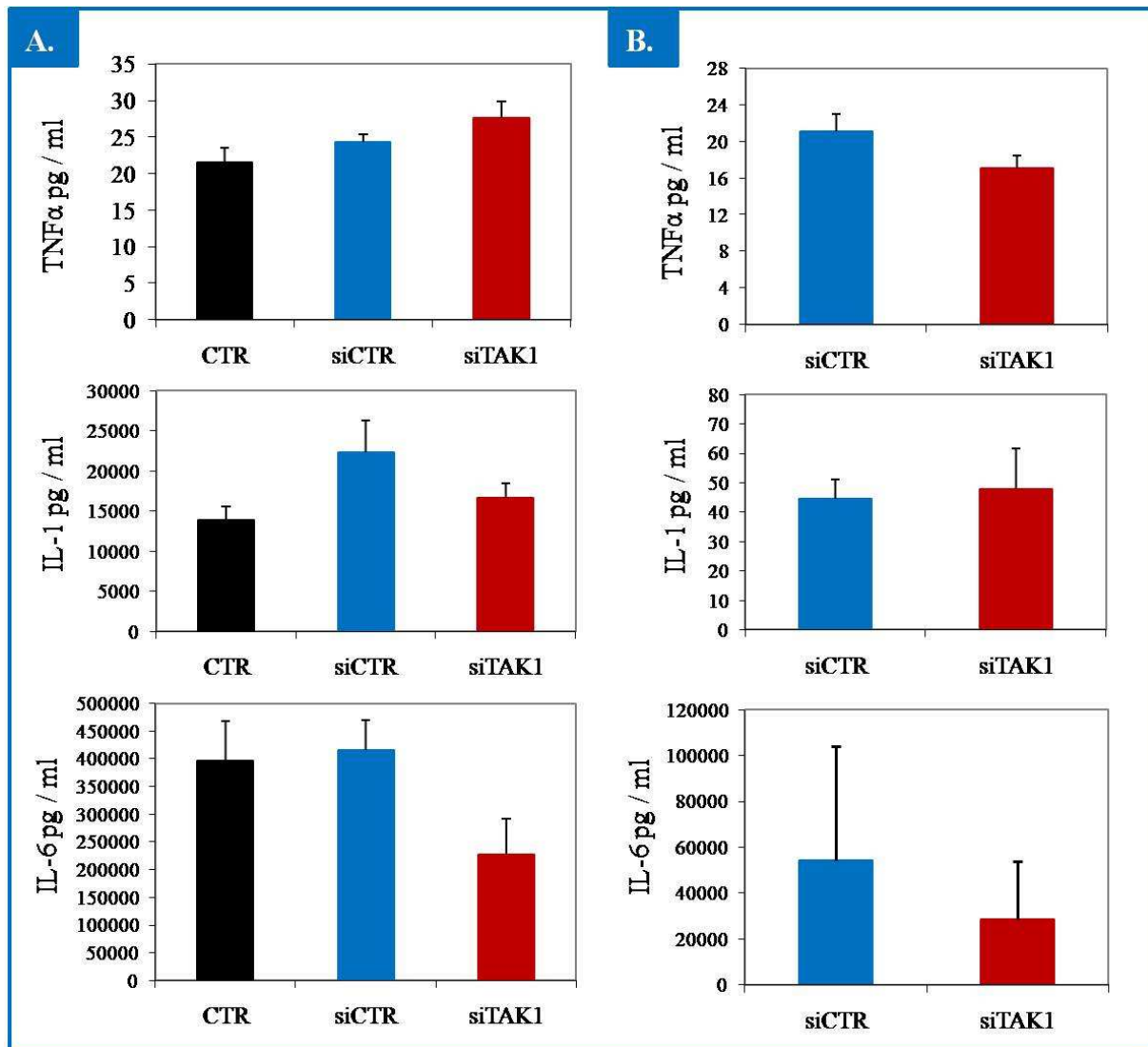


Abbildung 3-22 | Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die lokale Zytokinsekretion in Kollagen-induzierter Arthritis. Um den Einfluss der Inhibierung von TAK1 auf die lokale Entzündung zu untersuchen, wurde die Sekretion verschiedener Zytokine in Knie-umgebendes Medium mittels ELISA untersucht. In zwei unabhängigen Experimenten (A und B) konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von TAK1 keinen Einfluss auf die lokale Produktion von TNFα (A und B, oben) und IL-1 (A und B, Mitte) hat. Hier sind keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen (CTR, siCTR) und siTAK1-behandelten Mäusen (siTAK1) feststellbar. Die Produktion von IL-6 hingegen wird in beiden Experimenten durch die Inhibierung von TAK1 im Vergleich zu den Kontrollen reduziert (A und B, unten).

3.2.6 Inhibierung der TAK1- und der Zytokin-Expression durch die si-TAK1-Behandlung in der Milz

In vorangegangenen Studien von Khoury et al., 2006 wurde die Bioverteilung von siRNA Lipoplexen nach der intravenösen *in vivo*-Applikation untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zielorgane der siRNA hauptsächlich die Milz, die Leber und die Lunge waren. Aufgrund dieser Studien und der Tatsache, dass die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine in der Milz durch die siTAK1-Behandlung reduziert war (3.2.5.1, S.80), konzentrieren sich nachfolgende Studien bezüglich eines Wirkungsmechanismus der TAK1-siRNA in der Kollagen-induzierten Arthritis hauptsächlich auf die Milz.

3. Ergebnisse

Dazu war es zunächst erforderlich, die Expression von TAK1 in der Milz nachzuweisen und zu zeigen, dass diese durch die Behandlung mit der TAK1-siRNA reduziert wird. Dazu wurde die RNA aus den Milzen der behandelten Mäuse isoliert und die TAK1-Expression mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Zur Quantifizierung erfolgte die Normalisierung der zu vergleichenden Proben über das Haushalts-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-23 dargestellt und zeigen, dass die Expression von TAK1 in der siTAK1-Gruppe deutlich gegenüber den siCTR- und Enbrel-behandelten Gruppen reduziert ist. Enbrel ist ein Medikament, das bereits zur Behandlung von rheumatoider Arthritis eingesetzt wird. Es handelt sich dabei um einen sogenannten TNF α -Blocker, der in Form eines löslichen TNF α -Rezeptors die biologische Wirkung von TNF α inhibiert. In den Studien wurde Enbrel zum einen als Positivkontrolle eingesetzt, um die therapeutische Wirkung auf die Kollagen-induzierte Arthritis zu zeigen, und zum anderen dient es dazu, die therapeutische Effizienz mit der siTAK1-Behandlung zu vergleichen.

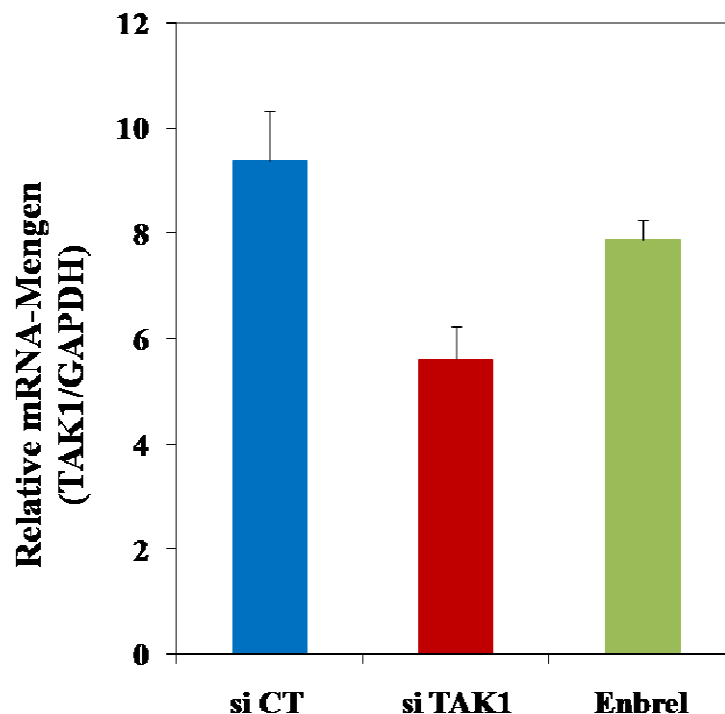


Abbildung 3-23 | *Inhibition von TAK1 in der Milz von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis.* Die TAK1-Expression wurde mit quantitativer RT-PCR in den Milzen der siCTR-, siTAK1- und Enbrel-behandelten Mäuse untersucht. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der TAK1 Expression in den Milzen der siTAK1-behandelten Mäuse gegenüber den Kontrollen (siCTR und Enbrel). Zur Quantifizierung erfolgte die Normalisierung der zu vergleichenden Proben über das Haushalts-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase).

Neben der Expressionsanalyse von TAK1 in der Milz wurde auf mRNA Ebene die Expression verschiedener Zytokine getestet (Abbildung 3-24). Die Expression von TNF α , IL-1 β und IL-6 ist in den siTAK1-behandelten Gruppen deutlich gegenüber den siCTR Gruppen reduziert (A-C). Die Enbrel-behandelte Gruppe hingegen weist keine Reduktion in der TNF α - und IL-1 β -Expression auf mRNA Ebene in der Milz auf (A und B), zeigt aber stark verminderte Mengen von IL-6 mRNA (C).

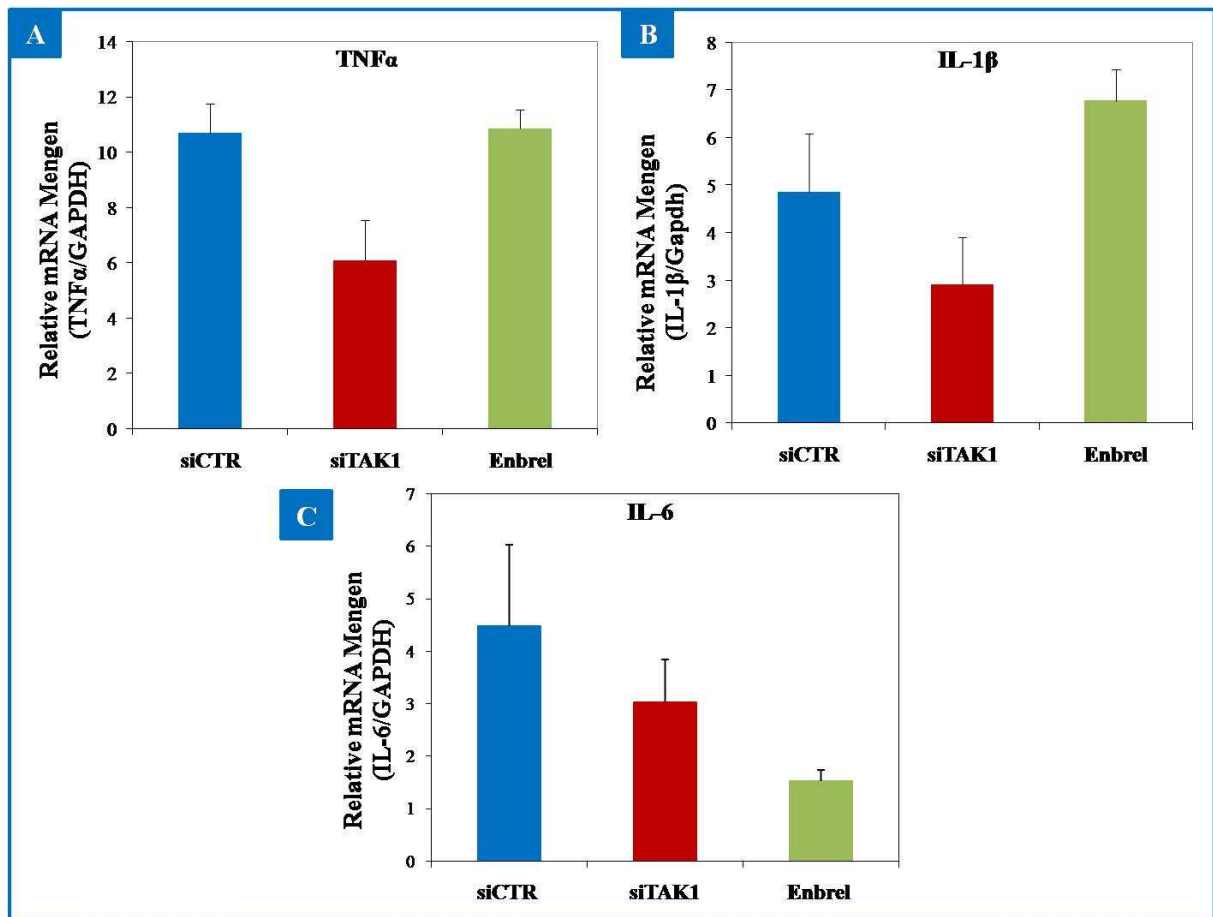


Abbildung 3-24 | Einfluss der TAK1-Inhibition auf die Zytokin-Expression in der Milz arthritischer Mäuse. Die Expression von TNFα (A), IL-1β (B) und IL-6 (C) in der Milz ist in den siTAK1-behandelten Mäusen deutlich reduziert im Vergleich zu den Kontrollmäusen (siCTR). Die mit Enbrel-behandelten Mäuse zeigen eine stark verminderte IL-6-Expression in der Milz, wohingegen die TNFα- und IL-1β-Expression vergleichbar zu der siCTR-Gruppe ist. Zur Quantifizierung erfolgte die Normalisierung der zu vergleichenden Proben über das Haushalts-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase).

Diese Ergebnisse belegen auf mRNA Ebene die zuvor gezeigten Daten aus der Milz (vgl. 3.2.5.1, S.80), in denen auf Proteinebene mittels ELISA eine Reduktion der TNFα- und IL-6-Produktion in der Milz gezeigt werden konnte. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Inhibition von TAK1 ihre Wirkung in der Milz entfaltet und dort zu einer Reduktion der Produktion von IFNγ (vgl. 3.2.5.1, S.80), TNFα, IL-1β und IL-6 führt.

3.2.7 Reduktion der TAK1 Expression in CD8⁺- und CD4⁺-Zellen der Milz

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die TAK1-Expression in der Milz aufgrund der siRNA Behandlung reduziert ist, stellte sich die Frage, welche Zelltypen davon betroffen sind und inwiefern diese mit der reduzierten Expression verschiedener Zytokine wie IFNγ, TNFα, IL-1β und IL-6 sowie der erhöhten Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (vgl. 3.2.5.1, S.80 und 3.2.6, S.84) korrelieren.

Hierzu wurden verschiedene Zelltypen, die mit der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht werden können, isoliert. Dazu zählen Makrophagen (CD11b⁺), dendritische Zellen (CD11c⁺), T-Helferzellen (CD4⁺) und zytotoxische T-Zellen (CD8⁺). Diese wurden durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS, 2.4.10.1, S.45) aus der Milz isoliert.

3. Ergebnisse

Die Analyse der Expression von TAK1 in den isolierten Zellen erfolgte mittels quantitativer RT-PCR und ist in Abbildung 3-25 dargestellt.

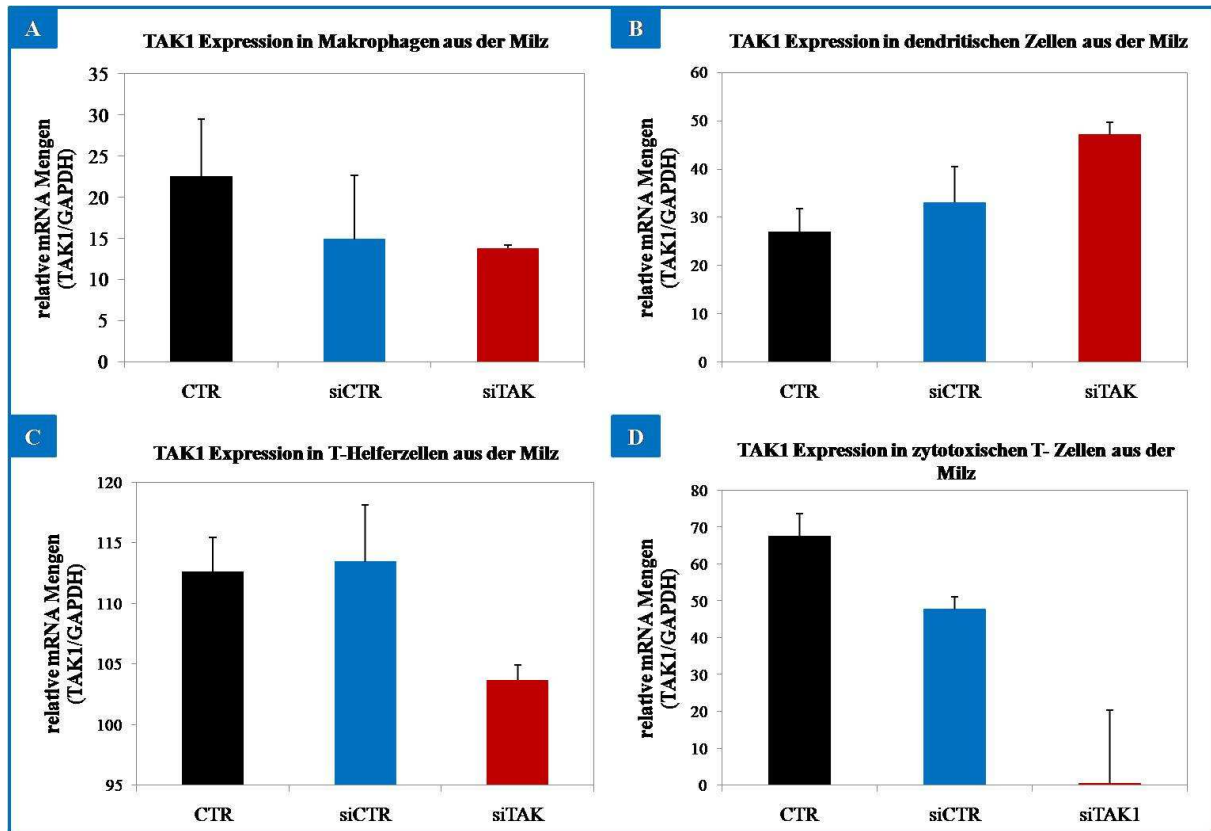


Abbildung 3-25 | Einfluss der siRNA gegen TAK1 auf die Expression von TAK1 in verschiedenen aus der Milz isolierten Zelltypen. Makrophagen (CD11b⁺, A), dendritische Zellen (CD11b⁺, B), T-Helferzellen (CD4⁺, C) und zytotoxische T-Zellen (CD8⁺, D) wurden aus den Milzen arthritischer, siRNA-behandelter Mäuse isoliert und mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von TAK1 untersucht. Während in CD11b⁺- und CD11c⁺-Zellen keine Reduktion der TAK1-Expression in den siTAK1-behandelten Mäusen festgestellt werden kann (A und B), zeigt sich in den CD4⁺-Zellen (C) eine leichte und in den CD8⁺-Zellen (D) eine starke Reduktion der TAK1-Expression in der siTAK1-behandelten Gruppe. Die TAK1-Expression wurde gegen das Haushalts-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) abgeglichen.

In den Makrophagen (CD11b⁺, A) und in den dendritischen Zellen (CD11c⁺, B) konnte dabei keine Reduktion der TAK1-Expression in den siTAK1-behandelten Mäusen festgestellt werden. Die Expressionshöhen von TAK1 entsprechen hier denen der Kontrollmäuse bzw. sind in den dendritischen Zellen in der siTAK1-behandelten Gruppe sogar höher (A und B). Im Gegensatz dazu konnte in den T-Zellen (C und D) eine Reduktion der TAK1-Expression in den siTAK1 behandelten Gruppen festgestellt werden. Diese ist in den zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺, D) deutlich stärker als in den T-Helferzellen (CD4⁺, C).

Die Behandlung der arthritischen Mäuse mit einer siRNA gegen TAK1 führt also zu der Reduktion der TAK1-Expression in zytotoxischen T-Zellen sowie in T-Helferzellen aus der Milz, nicht jedoch in Makrophagen oder dendritischen Zellen. Somit scheinen die T-Zellen die primären Zielzellen der systemisch applizierten siRNA gegen TAK1 in der Milz zu sein.

3.2.8 Beeinflussung der Zytokin-Expression von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in der Milz durch die Inhibierung von TAK1

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch die Behandlung mit einer siRNA gegen TAK1 die Expression von TAK1 in den T-Zellen der Milz reduziert wurde, stellte sich die Frage, ob dies zu der beobachteten Beeinflussung der Zytokin-Expression in der Milz führt. T-Zellen tragen wesentlich zum inflammatorischen Zytokinmilieu in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis bei. Sie sind die Hauptproduzenten von IFN γ , sind aber auch in die Produktion von TNF α , IL-10 und IL-6 involviert.

Um zu untersuchen, ob die Inhibierung von TAK1 die Zytokin-Expression von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in der Milz beeinflusst, wurde die Produktion von IFN γ , TNF α und IL-10 in diesen Zellen durch intrazelluläre Zytokin-Färbung untersucht (vgl. 2.4.10.2, S.47). Die Auswahl der Zytokine erfolgte aufgrund der Vorversuche, die gezeigt hatten, dass die Produktion von TNF α und IFN γ in der Milz reduziert und die Produktion von IL-10 gesteigert wird (vgl. 3.2.5.1, S.80 und 3.2.6, S.84). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-26, S.89 dargestellt.

TNF α wird in hohem Maße von CD4⁺- und weniger von den CD8⁺-T-Zellen der Milz arthritischer Mäuse produziert (Abbildung 3-26, A, siCTR). Die Behandlung mit einer siRNA gegen TAK1 bzw. Enbrel führt zu einer deutlichen Reduktion der TNF α -Produktion in den CD4⁺-Zellen, wobei eine Verminderung um 65 % gegenüber der siCTR-behandelten Gruppe verzeichnet werden kann. Da es sich bei Enbrel um einen TNF α -Blocker handelt, war diese Reduktion der TNF α -Produktion in der Enbrel-behandelten Gruppe durchaus zu erwarten. Erstaunlich ist, dass mit der Inhibition von TAK1 durch die siRNA-Behandlung eine gleichwertige Reduktion in der TNF α -Produktion erreicht werden kann. Bezüglich der TNF α -Produktion von CD8⁺-Zellen kann ebenfalls eine Reduktion derselben verzeichnet werden, die sich bezogen auf den Ausgangswert bei den siCTR-behandelten Mäusen auf ~25 % in den si-TAK1-Mäusen und ~50 % in den Enbrel Mäusen beläuft. Insgesamt kann man sagen, dass die Inhibition von TAK1 in den CD4⁺- und den CD8⁺-Zellen der Milz zu einer deutlichen Reduktion der TNF α -Produktion in diesen Zellen führt, wobei die CD4⁺-Zellen stärker zur TNF α -Produktion in der Arthritis beitragen und diese auch verstärkt durch die Inhibition von TAK1 reduziert werden kann (Abbildung 3-26, A).

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das hauptsächlich von Th2-Zellen produziert wird, aber auch von Makrophagen und naiven T-Zellen. Es inhibiert die Produktion inflammatorischer Zytokine und fördert die Differenzierung von Th2-Zellen bei gleichzeitiger Inhibition von Th1-Zellen. Der Einfluss der TAK1-Inhibition auf die IL-10-Produktion von CD4⁺- und CD8⁺- Zellen der Milz arthritischer Mäuse ist in Abbildung 3-26, B dargestellt. Hier wird die IL-10 Produktion von CD4⁺-Zellen in den siTAK1- und zu einem stärkeren Maß in den Enbrel-behandelten Gruppen gesteigert, während die IL-10-Produktion durch CD8⁺-Zellen in diesen Gruppen gegenüber den siCTR behandelten Gruppen vermindert wird. Es ergibt sich also eine gegenläufige Wirkung der Inhibition von TAK1 auf die IL-10-Produktion, was sich in einer gesteigerten IL-10-Produktion durch CD4⁺-Zellen bei gleichzeitiger Verminderung der Produktion durch CD8⁺-Zellen ausdrückt (Abbildung 3-26, B).

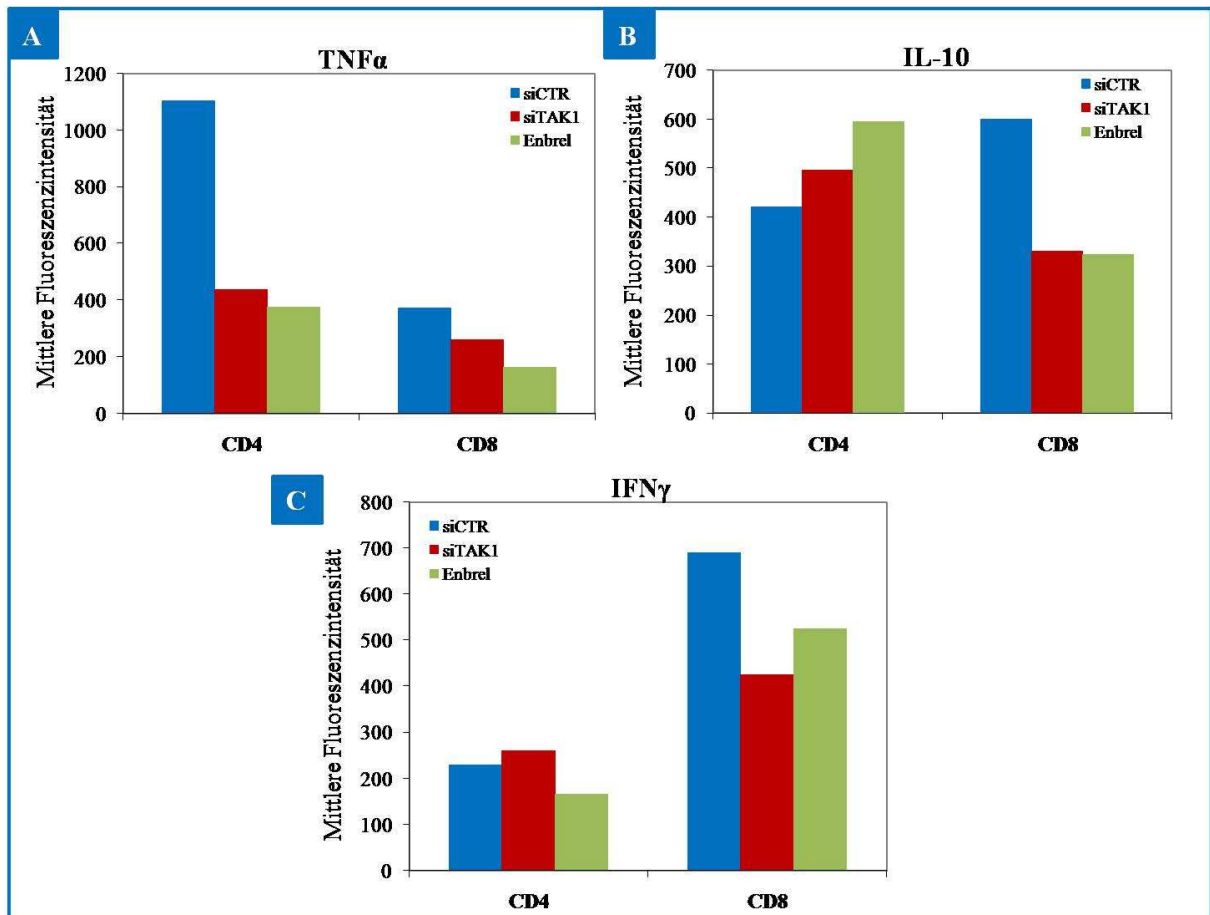


Abbildung 3-26 | Beeinflussung der Zytokin-Expression von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen durch die Inhibierung von *TAK1*. $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen aus der Milz arthritischer, siTAK1-, siCTR- und Enbrel-behandelter Mäuse wurden hinsichtlich ihrer Zytokin-Produktion mittels intrazellulärer Zytokin-Färbung für TNFα (A), IL-10 (B) und IFNγ (C) untersucht. A. Die Produktion von TNFα ist in den $CD4^+$ -Zellen aus siTAK1- und Enbrel-behandelten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollzellen stark reduziert, während die Produktion von TNFα durch $CD8^+$ -Zellen nur leicht in der siTAK1- und Enbrel-Gruppe reduziert ist. B. Die $CD4^+$ -Zellen der siTAK1- und Enbrel-Gruppe zeigen eine erhöhte Produktion von IL-10, während diese in den $CD8^+$ -Zellen gegenüber der siCTR-Gruppe reduziert ist. C. Die IFNγ-Produktion in den $CD8^+$ -Zellen ist in der siTAK1-Gruppe deutlich, in der Enbrel-Gruppe leicht gegenüber der siCTR-Gruppe reduziert. In $CD4^+$ -Zellen ist die IFNγ-Produktion in allen Gruppen annähernd gleich.

IFNγ ist ein maßgebliches Effektorzytokin von Th1-Zellen, das deren Proliferation fördert und die der Th2-Zellen inhibiert. Die Hauptproduzenten von IFNγ in der rheumatoiden Arthritis sind $CD8^+$ -Zellen, während die $CD4^+$ -Zellen in vergleichsweise geringen Mengen zu der IFNγ-Produktion beitragen. Dies zeigt sich auch in der Untersuchung der IFNγ-Produktion durch $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen aus der Milz durch die intrazelluläre Zytokin-Färbung in den siCTR-behandelten, arthritischen Mäusen (Abbildung 3-26, C). In den $CD8^+$ -Zellen ist mehr als dreimal so viel IFNγ im Vergleich zu den $CD4^+$ -Zellen nachweisbar. Dabei wird die IFNγ-Produktion in den $CD4^+$ -Zellen durch die Behandlung mit der siRNA gegen TAK1 bzw. durch die Behandlung mit Enbrel nicht beeinflusst und bleibt in allen Gruppen annähernd konstant. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine deutliche Reduktion der IFNγ-Produktion durch die $CD8^+$ -Zellen in der siTAK1 Gruppe. Auch in den Enbrel behandelten Mäusen ist die IFNγ-Produktion im Vergleich zu der siCTR-Gruppe gesenkt, jedoch nicht so stark wie in der siTAK1-Gruppe. Die Inhibierung von TAK1 in den $CD8^+$ -Zellen der Milz

arthritischer Mäuse führt also zu einer starken Inhibition von $\text{IFN}\gamma$ in diesen Zellen, während die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch die CD4^+ -Zellen nicht beeinflusst wird.

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass die nachweisliche Reduktion der TAK1-Expression in den CD4^+ - und CD8^+ -T-Zellen der Milz durch die siTAK1-Behandlung mit der Beeinflussung der Produktion verschiedener Zytokine korreliert. Dabei kann gegenüber den Kontrollen eine deutlich verminderte $\text{TNF}\alpha$ -Produktion durch CD4^+ - und CD8^+ -Zellen, eine verminderte $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch CD8^+ -Zellen und eine erhöhte IL-10 Produktion durch CD4^+ -Zellen in den siTAK1-behandelten Mäusen festgestellt werden.

Hierbei ist jedoch anzumerken, dass diese Ergebnisse nur auf einem durchgeführten Experiment basieren, bei welchem die Milzzellen aller Mäuse einer Gruppe (5 Mäuse/Gruppe) zusammengefasst wurden. Aus diesem Grund kann keine statistische Signifikanz angegeben werden und es bedarf auf jeden Fall weiterer Untersuchungen, um die Ergebnisse zu bestätigen. Dabei sollte jedoch auch erwähnt werden, dass diese Untersuchungen sehr gut mit den bisherigen Ergebnissen der Zytokin-Expressionsmuster in der Milz übereinstimmen (vgl. 3.2.5.1, S.80 und 3.2.6, S.84) und deshalb durchaus bedeutsam scheinen.

3.2.9 Reduktion der TAK1-Expression in CD8^+ - und CD4^+ -Zellen der Lymphknoten

Da die Behandlung arthritischer Mäuse mit der siRNA gegen TAK1 anscheinend hauptsächlich die T-Zellen und deren Zytokin-Expressionsmuster in der Milz zu beeinflussen schien, stellte sich die Frage, ob auch T-Zellen anderer lymphoider Organe wie z.B. die der Lymphknoten durch die siTAK1-Behandlung beeinflusst werden. Dazu wurden CD4^+ - und CD8^+ -T-Zellen aus den Lymphknoten der behandelten Mäuse isoliert und mittels quantitativer RT-PCR die Expression von TAK1 in diesen Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-27, S.91 dargestellt. Es zeigt sich dabei, dass die Expression von TAK1 in der siTAK1-behandelten Gruppe, sowohl in CD4^+ -Zellen als auch in CD8^+ -Zellen der Lymphknoten gegenüber den siCTR- und den Enbrel-behandelten Gruppen deutlich reduziert ist (A und B). Dabei kann in beiden Zelltypen eine Reduktion der TAK1-Expression um ca. 50 % im Vergleich zu den siCTR CD4^+ - und CD8^+ -Zellen festgestellt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die TAK1-Expression nicht nur in den T-Zellen der Milz sondern auch in den T-Zellen der Lymphknoten durch die Behandlung mit der TAK1-siRNA deutlich reduziert wird. Dies muss allerdings noch anhand weiterer Studien geprüft werden, da es nur das Ergebnis eines Experiments repräsentiert, d.h. dass die T-Zellen aus den Lymphknoten von 5 Mäusen pro Gruppe zusammengefasst und auf die TAK1-Expression hin untersucht wurden.

Inwieweit T-Zellen anderer Organe oder andere Zelltypen in anderen Organen betroffen sind, muss noch weiter untersucht werden und wird ebenfalls Gegenstand weiterer Studien sein.

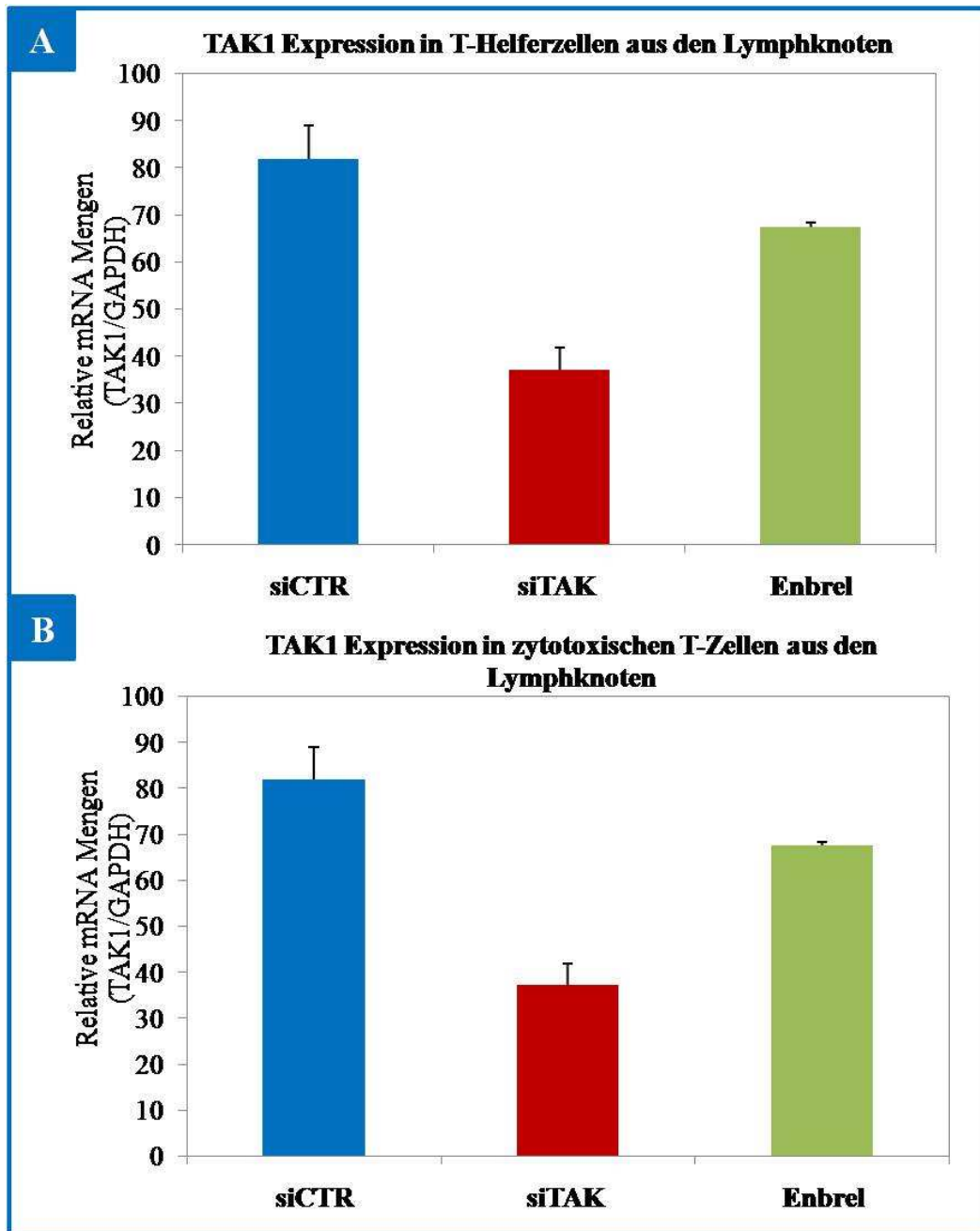


Abbildung 3-27 | Einfluss der siTAK1-Behandlung auf die TAK1-Expression in $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen der Lymphknoten arthritischer Mäuse. T-Helferzellen ($CD4^+$, A) und zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$, B) wurden aus den Lymphknoten arthritischer, siRNA- bzw. Enbrel-behandelter Mäuse isoliert und mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von TAK1 untersucht. Dabei ist die TAK1-Expression sowohl in den $CD4^+$ - (A) als auch in den $CD8^+$ -Zellen (B) deutlich gegenüber den siCTR- bzw. Enbrel-behandelten Gruppen reduziert. Die TAK1-Expression wurde gegen das Haushalts-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) abgeglichen.

3.2.10 Beeinflussung der Zytokin-Expression von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in den Lymphknoten durch die Inhibierung von TAK1

Nachdem gezeigt wurde, dass die TAK1-Expression in den CD4⁺- und den CD8⁺-T-Zellen der Lymphknoten ebenfalls in der siTAK1-Gruppe reduziert ist, wurde der Einfluss dieser Reduktion auf die Zytokinexpression von IFN γ und TNF α in diesen Zellen mittels quantitativer RT-PCR untersucht, da die Probenmengen für einen ELISA- oder eine FACS-Analyse nicht ausreichend waren. IL-10 war auf mRNA Ebene in diesen Zellen nicht nachweisbar. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-28 dargestellt.

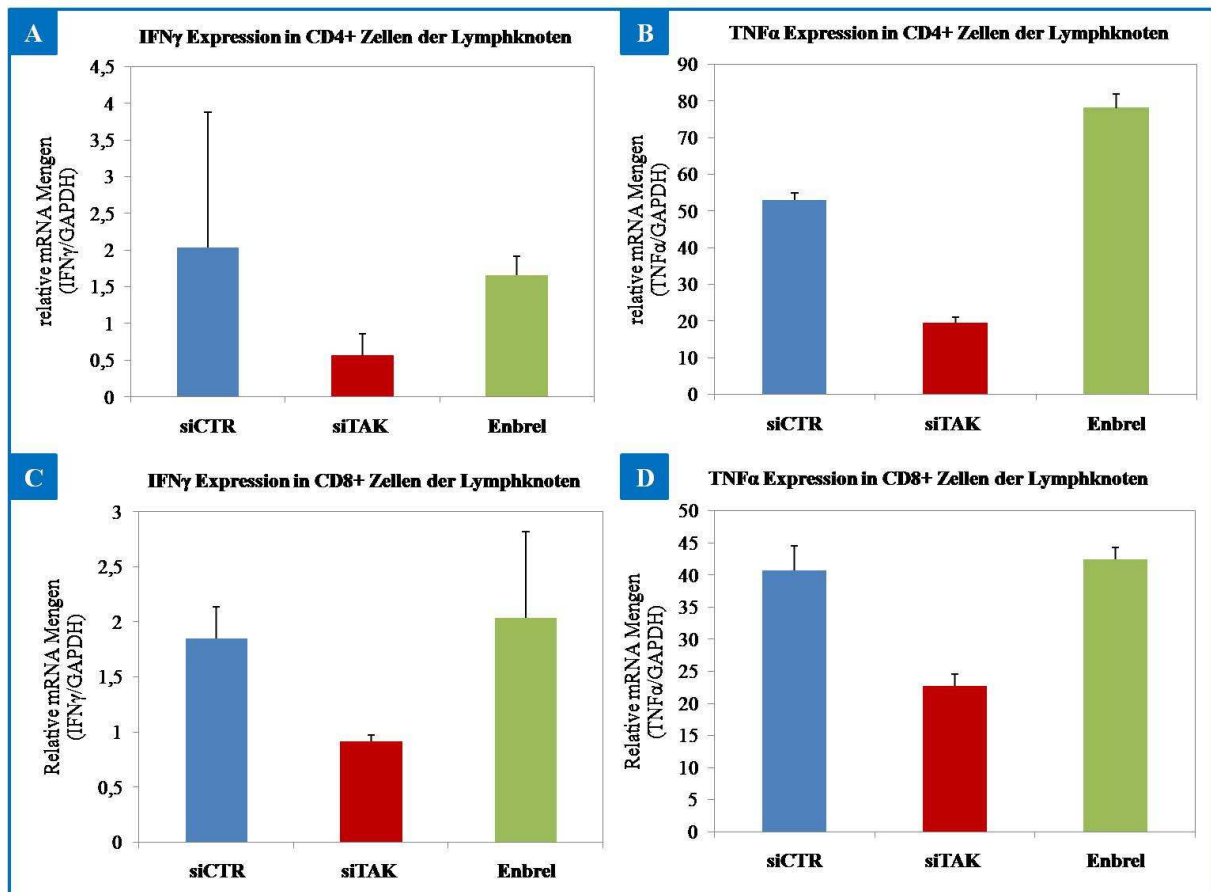


Abbildung 3-28 | Einfluss der TAK1 Inhibition auf die Zytokinexpression in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der Lymphknoten arthritischer Mäuse. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die Expression von TNF α (B und D) und IFN γ (A und C) in CD4⁺ (A und B) und CD8⁺ (C und D) Zellen aus den Lymphknoten arthritischer, siCTR, siTAK1 oder Enbrel behandelter Mäuse untersucht. Dabei zeigte sich eine Reduktion von TNF α als auch IFN γ in beiden, CD4⁺ und CD8⁺, Zelltypen. Zur Quantifizierung erfolgte die Normalisierung der zu vergleichenden Proben über das Haushalts-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase).

Es zeigt sich sowohl in CD4⁺- als auch in CD8⁺-Zellen eine deutliche Reduktion der TNF α - sowie der IFN γ -Expression (A-D). Die Inhibierung von TAK1 beeinflusst also die Expression der Zytokine TNF α und IFN γ durch CD4⁺- und CD8⁺-Zellen aus den Lymphknoten. Auch diese Ergebnisse müssen durch weitere Experimente weiter bestätigt werden und basieren nur auf den Daten eines Experiments, bei dem die CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen aus den Lymphknoten von 5 Mäusen pro Gruppe zusammengefasst wurden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Inhibierung von TAK1 *in vitro* mit der inflammatorischen Signalweiterleitung in einer Makrophagenzelllinie und einer mesenchymalen Vorläuferzelllinie interferiert (vgl. 3.1, S.59). Eine auf diesen Beobachtungen aufbauende kurative Behandlung von Kollagen-induzierter Arthritis in Mäusen durch systemische Applikation einer siRNA gegen TAK1 zeigte eine therapeutische Wirkung. Diese ging mit einer Reduktion der Pfotenschwellung, des Arthritiswertes und der Häufigkeit in den mit einer siRNA gegen TAK1 behandelten Mäusen einher. Die Ergebnisse dieser Studie lassen darauf schließen, dass die siRNA-vermittelte Inhibierung von TAK1 ihre anti-inflammatorische Wirkung maßgeblich in der Milz, aber auch in den Lymphknoten entfaltet und dort die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL}1\beta$ und IL-6 durch zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen inhibiert sowie das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 stimuliert. Dieser Einfluss auf die T-Zellen ist jedoch nicht auf die Beeinflussung der Proliferation von T-Zellen oder einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den T-Helferzellpopulationen Th1 und Th2 zurückzuführen, woraus auf eine direkte Involvement von TAK1 in die Zytokin-Produktion in diesen Zellen geschlossen werden muss.

4 Diskussion

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung unbekannter Ursache, in deren Verlauf es zu einer starken Entzündungsreaktion in den Gelenken kommt. Dabei werden Knochen und Knorpel im Gelenk angegriffen und abgebaut (Firestein, 2003). Die Entzündung als auch die Gelenkdegradation wird maßgeblich durch die Produktion von inflammatorischen Zytokinen vermittelt, die in einem komplexen Netzwerk agieren (McInnes, et al., 2007). Derzeitige Therapien, wie zum Beispiel der Einsatz sogenannter TNF α -Blocker, basieren auf der Inhibition pro-inflammatorischer Zytokine, wobei große Erfolge in der Behandlung von Patienten mit rheumatoider Arthritis erreicht werden konnten. Dennoch gibt es gewisse Limitierungen der Behandlung, da unter anderem viele Patienten nicht auf eine TNF α -basierte Therapie ansprechen. Dies und andere Gründe resultieren in immer neuen Therapieansätzen und der Suche nach alternativen Therapiestrategien. Dabei werden auch große Anstrengungen im Bereich der gentherapeutischen Administration gemacht, sei es über virale Vektoren oder den Transfer *ex vivo*-veränderter Zellen.

Dabei sind unter anderem auch Moleküle der Signalweiterleitung in den Vordergrund getreten. Zytokine aktivieren durch die Bindung an ihre Zelloberflächenrezeptoren verschiedene Signalkaskaden, die wiederum die Produktion weiterer Zytokine als auch von Matrix-zerstörenden Proteasen fördern. Wichtige Signalkaskaden in der rheumatoiden Arthritis sind die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sowie der Nuklear-Faktor- κ -B (NF κ B), die alle in aktivierter Form im rheumatoiden Synovium nachgewiesen werden können (Simmonds, et al., 2008; Schett, et al., 2000). Ein wesentlicher Bestandteil der Signalweiterleitung in MAPK- und NF κ B-Kaskaden ist die TGF- β -aktivierte-Kinase-1 (TAK1), die jedoch auch in BMP- (‘bone morphogenetic protein’) und TGF- β -induzierten Differenzierungsprozessen eine Rolle spielt (Hoffmann, et al., 2005; Shim, et al., 2005; Shibuya, et al., 1998). Aufgrund dieser Schlüsselposition in verschiedenen Signalwegen stellt die Inhibition von TAK1 ein potentiell Ziel zur therapeutischen Behandlung entzündlicher Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis dar.

4.1 Gentherapeutische Strategien

4.1.1 siRNAs zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels einer siRNA-basierten anti-TAK1 Strategie gezeigt werden, dass die Inhibition von TAK1 einen therapeutischen Effekt auf die rheumatoide Arthritis im Mausmodell hatte.

Die siRNA-Technologie ist ein natürlich vorkommender Mechanismus zur sequenzspezifischen Inhibition der Genexpression, der von eukaryotischen Zellen verwendet wird, um die Expression endogener Gene zu hemmen. *In vitro* ist die Verwendung von siRNAs schon zu einer Standardtechnik geworden, doch bietet sie mittlerweile auch ein enormes Potential für klinische Anwendungen und siRNA-basierte Therapien befinden sich schon in der klinischen Entwicklungsphase für verschiedene Krankheiten wie der Makuladegeneration (Shen, et al., 2006; Cashman, et al., 2006), Hepatitis B (Wu, et al., 2005) und C (Kim, et al., 2006), Asthma

(Popescu, 2005), Chorea Huntington (Wang, et al., 2005), Diabetes (Xu, et al., 2007; Xu, et al., 2005) und Krebs (Chen, et al., 2006; Filieure, et al., 2003).

Die Verwendung von siRNAs zur therapeutischen Behandlung von inflammatorischen Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis ist ein noch relativ neuer und innovativer Anwendungsbereich. Bisher existieren nur wenige Veröffentlichungen, die eine siRNA-basierte Inhibition zur therapeutischen Anwendung in einem Arthritismodell zeigen. Dies ist zum einen auf die Instabilität der siRNA-Moleküle, die vor allem bei einer systemischen Applikation durch RNasen und durch die Eliminierung durch die Nieren vermittelt wird, und zum anderen auf eine geringe Transfektionseffizienz zurückzuführen (Soutschek, et al., 2004). Für den systemischen Einsatz *in vivo* müssen den siRNAs „Medikamenten-ähnliche“ Eigenschaften verliehen werden, wie Stabilität, zellulärer Zugang und biologische Verfügbarkeit in den Geweben. Dazu wurden zahlreiche, nicht-virale Ansätze, wie chemische siRNA-Stabilisation oder Modifikation, Einkapselung der siRNA in Liposomen und die Bindung der siRNA an kationische oder andere Trägerpartikel getestet (Sioud, et al., 2003; Crombrez, et al., 2007; Howard, et al., 2006). Durch die Verwendung eines neuartigen Systems für die systemische Applikation der siRNA, das auf der Komplexierung mit einem kationischen Liposomengemisch und einer Carrier-DNA beruht (Lipoplexe) und von der Arbeitsgruppe um Christian Jorgensen in Frankreich entwickelt wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit ein für siRNA-Applikationen langanhaltender Effekt bei gleichzeitiger Verwendung von niedrigen siRNA-Dosen erreicht werden. Die Frequenz der Behandlung konnte dabei auf eine einmalige wöchentliche Applikation reduziert werden, wobei nur 10 µg siRNA pro Maus injiziert wurden (Khoury, et al., 2006). In anderen *in vivo*-Studien wurden siRNAs dreimal wöchentlich bis hin zu täglich appliziert um einen gleichbleibenden Effekt zu erzielen, wobei bis zu sechsmal mehr siRNA pro Maus eingesetzt wurde (Morrissey, et al., 2005; Soutschek, et al., 2004). Die Verwendung von Lipoplexen erhöht also scheinbar die Zirkulationszeit und/oder verstärkt die Aufnahme bzw. den Erhalt der siRNA in den Geweben. Dabei verstärkt die Komplexierung mit dem kationischen Liposomen-Gemisch die Stabilität der siRNA und schützt diese vor dem Abbau von Nukleasen, während die zugesetzte Carrier-DNA verwendet wird um die Partikelgröße der Lipoplexe in den nanometrischen Bereich anzuheben und damit eine weitere Stabilisierung zu gewährleisten, die eine längere Zirkulationszeit im Serum mit sich bringt. Dieses System wurde bereits in vorherigen Studien mit einer siRNA basierten anti-TNF α -Therapie erfolgreich in Kollagen-induzierter Arthritis getestet (Khoury, et al., 2006), wobei die anti-TAK1 Therapie durchaus vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Arthritiswertes und der Ausprägung der Arthritis zeigte und damit eine wirkliche Alternative zu einer TNF α -basierten Therapie darstellen könnte.

Bezüglich der Nebeneffekte und Sicherheitsrisiken einer siRNA-basierten Therapie gibt es Beobachtungen über siRNA-induzierte Immunantworten in Immunzellen, insbesondere die Induktion einer IFN-Antwort. Einige synthetische siRNAs induzieren pro-inflammatorische Zytokine, wie IFN γ , TNF α und IL-6 (Diebold, et al., 2004; Heil, et al., 2004). Jedoch verursachen nicht alle siRNAs solche Antworten und es konnte gezeigt werden, dass diese immunstimulatorischen Effekte sequenzspezifisch auftreten, d.h., dass nur einige Sequenzen inflammatorische Antworten auslösen, während andere keinen Effekt haben (Sioud, 2005). Inwieweit die Sequenz der TAK1-spezifischen siRNA derartige Effekte auslöst muss noch einge-

hender untersucht werden. In den durchgeführten Versuchen allerdings konnten keine toxischen Effekte der siRNA Behandlung beobachtet werden, was auch auf die Verwendung der sehr geringen Mengen an siRNA (0,5 mg/kg) zurückzuführen sein könnte. Es wurde bis zu sechsmal weniger siRNA eingesetzt als in den Studien, die eine IFN-Antwort durch die siRNA-Gabe beobachteten. Von Khoury et al. wurde gezeigt, dass durch die auch in dieser Arbeit verwendeten Liposomen zusammen mit der Carrier-DNA keine IFN-Antwort ausgelöst wird (Khoury, et al., 2006). Außerdem scheint die IFN-Antwort vorzugsweise von siRNAs ausgelöst zu werden, die von shRNAs (‘short-hairpin RNAs’) herrühren und über Plasmide oder lentivirale Konstrukte exprimiert werden (Bridge, et al., 2003). Die potentielle Induktion einer IFN-Antwort würde sicherlich ein großes Hindernis für die klinische Anwendung von siRNAs bedeuten und muss auf jeden Fall weiter untersucht werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass im Bereich der *in vivo*-Applikation von siRNAs große Fortschritte bezüglich der Stabilität und der Transfektionseffizienz gemacht werden konnten. Dabei zeigt sich ein großes Potential für zukünftige klinische Anwendungen in der rheumatoiden Arthritis, wobei jedoch definitiv immer noch weitere Verbesserungen insbesondere der Stabilität notwendig sein werden. Die Verwendung von siRNAs als therapeutische Strategie zur Behandlung von rheumatoider Arthritis könnte dabei eine wirkliche Alternative zu derzeitigen Therapien darstellen.

4.1.2 Viral basierte Inhibierung von TAK1

Da die rheumatoide Arthritis eine chronische Erkrankung ist, die einer Langzeit-Behandlung bedarf, sollte eine entsprechende gentherapeutische Strategie eine Inhibierung von TAK1 über einen längeren Zeitraum gewährleisten. Da der Lipoplex-vermittelte siRNA-Effekt nur über einen relativ kurzen Zeitraum von einer Woche aufrechterhalten werden kann, sollte über alternative Strategien nachgedacht werden. Eine davon könnte die Transkription der siRNAs von geeigneten Expressionsplasmiden oder viralen Vektoren in den Zielzellen sein. Diese Strategie eignet sich allerdings mehr zur lokalen Inhibierung in spezifischen Geweben als für eine systemische Administration. Für siRNAs werden derzeit fünf verschiedene virale Vektoren verwendet, die Lentiviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren (AAVs) und Baculoviren. Dabei konnte die Effektivität von lentiviralen und adeno-assoziierten Vektoren, die therapeutische Moleküle exprimieren, schon erfolgreich in Modellen der rheumatoiden Arthritis getestet werden (Apparailly, et al., 2002; Kato, et al., 2005). Der Einsatz von Lentiviren in der rheumatoiden Arthritis ist vorteilhaft, da sie die Fähigkeit besitzen ruhende Zellen, wie infiltrierende Makrophagen und synoviale Zellen im rheumatoiden Pannus, zu infizieren und dabei eine stabile Genexpression gewährleisten (Gouze, et al., 2003). Dies verhindert eine immer neue Administration des Therapeutikums und ist eine vorteilhafte Strategie bei der Behandlung chronischer Erkrankungen. Dabei bieten virale Systeme einen weiteren Vorteil, da in speziellen Plasmiden die Genexpression induziert werden kann. Ein Beispiel ist auch das in den *in vitro*-Studien der vorliegenden Arbeit an mesenchymalen Vorläuferzellen verwendete Tetrazyklin-basierte System, bei welchem die Genexpression nur in Anwesenheit des Tetrazyklin-Analogons Doxzyzyklin erfolgt (vgl. 2.5.2, S.49). Diese Art der Genexpressionskontrolle gewährleistet, dass die Genexpression, je nach Krankheitszustand an- bzw. abgeschaltet werden könnte und bildet eine wichtige Grundlage bei der Behandlung von Krankheiten, die eine ständige Anpassung der Therapie an die wechselnde Krankheitsaktivität, wie sie bei der

rheumatoiden Arthritis vorkommt, erfordern (Van de Loo, et al., 2004; Chernajovsky, et al., 2004; Moitz, et al., 2006). Mit der Doxyzyklin-abhängigen Genexpression in einem lentiviralen System könnte diese Limitierung derzeitiger Therapien umgangen werden, da das therapeutische Transgen über einen langen Zeitraum kontrolliert freigesetzt und folglich sowohl die Effizienz als auch die Nebenwirkungen der Therapie reduziert werden könnte (Van de Loo, et al., 2004; Traister, et al., 2008). Zum anderen ist die Verwendung von Lentiviren an sich vorteilhaft, da diese in hohen Titern produziert werden können. Sie infizieren sowohl sich teilende als auch nicht-teilende Zellen und können stabil in das Wirtsgenom integriert werden. Damit ist eine dauerhafte Genexpression gewährleistet, was für eine Langzeittherapie notwendig ist. Natürlich gibt es bei der Verwendung von Lentiviren auch Nachteile, die die therapeutische Nutzbarkeit einschränken. So integrieren Lentiviren an einer zufälligen Stelle in das Genom und können dadurch Mutationen hervorrufen und zur Onkogenese führen, was jedoch auch für andere Retroviren gilt, die stabil ins Genom integriert werden (Chernajovsky, et al., 2004; Connolly, 2002).

Im Bezug auf TAK1 könnte auch ein lentivirales System zur Expression der dominant-negativen Form von TAK1 als Alternative zur Inhibierung der endogenen TAK1 Expression durch siRNAs verwendet werden.

4.2 Welche Vorteile bietet eine anti-TAK1 Strategie gegenüber anderen Signalmolekülen?

Die Inhibierung von Signalmolekülen als eine anti-rheumatische Strategie zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis steht schon seit längerem im Fokus der Forschung. Dabei wurden bisher große Anstrengungen bei der Inhibierung der MAPK p38 und des Transkriptionsfaktors NFκB unternommen, die jedoch von zahlreichen Nebenwirkungen begleitet werden und deshalb in ihrer klinischen Anwendbarkeit eingeschränkt sind. Natürlich werden deshalb auch andere Moleküle der Signaltransduktion für eine therapeutische Strategie in Erwägung gezogen. Dazu gehört u.a. auch die MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (MK2), eine im Signalweg unterhalb von p38 gelegene Kinase (Hegen, et al., 2006). TAK1 hingegen liegt im Signalweg oberhalb von p38 und kann dadurch nicht nur p38 Signalwege, sondern auch NFκB Signalwege beeinflussen. Dabei ist das Targeting von TAK1 als anti-rheumatische Strategie neu und wurde vorher noch nicht in *in vivo* Modellen für Arthritis getestet.

4.2.1 TAK1 im Vergleich zu p38 und NFκB

NFκB Moleküle umfassen eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in Immun- und Entzündungsprozessen spielen und in die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis impliziert sind (Ghosh, et al., 1998; Han, et al., 1998). Makarov richtete 1997 als Erster die Aufmerksamkeit auf die zentrale Rolle von NFκB bei der Expression von Genen, die mit der Entzündung und Gewebeerstörung der rheumatoiden Arthritis assoziiert sind (Makarov, et al., 1997). Seitdem wurden viele Versuche unternommen, um die NFκB-Aktivität als therapeutische Strategie zur Behandlung von rheumatoider Arthritis zu blockieren. Gen-basierte Ansätze umfassen unter anderem die Verwendung von Adenoviren zur Gabe von ‚super‘ IκB (Inhibitor von NFκB, der resistent gegen Phosphorylierung und damit gegen den Abbau durch das Proteasom ist) oder eine dominant-negative Form von IKK-β (IκB Kinase-β) sowie die

Transfektion mit sogenannten ‚decoy‘-Oligonukleotiden. Alle diese Ansätze erwiesen sich in Tiermodellen für rheumatoide Arthritis als effektiv (Miagkov, et al., 1998; Tak, et al., 2001; Tomita, et al., 1999). Obwohl schon 10 Jahre seit dem ersten Versuch NFκB als therapeutisches Ziel zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis einzusetzen vergangen sind, konnte kein NFκB-basierter Therapieansatz bis in die Klinik vordringen. Es gibt Berichte über Klinische Phase I Studien mit ‚decoy‘-Oligonukleotiden aus dem Jahr 2003, die jedoch bis heute keine weitere Erwähnung finden (Nakagami, et al., 2006). Neben den zahllosen Berichten über die Schlüsselrolle von NFκB in inflammatorischen Krankheiten gibt es nämlich auch eine Reihe von Sicherheitsrisiken, die die Blockierung von NFκB mit sich bringt. NFκB spielt eine wichtige Rolle bei der Wirtsverteidigung, Homöostase, dem Überleben von Zellen und der Stressantwort. Eine systemische Inhibition birgt aus diesen Gründen enorme Risiken (Firestein, 2004). Einige Defekte in der Wirtsverteidigung, die mit der Blockierung von NFκB einhergehen, konnten schon identifiziert werden, wie eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, z.B. mit *Listeria monocytogenes* (Sha, et al., 1995). Weiterhin birgt die durch eine NFκB Inhibition induzierte Apoptose ein hohes Potential für Kollateralschäden in normalen oder physiologisch gestressten Geweben. Dabei ist ein wichtiges Beispiel die hepatische Apoptose, die in IKK-2- oder RelA-knockout Mäusen beobachtet werden kann (Tanaka, et al., 1999). In Krankheiten, die durch eine erhöhte TNFα-Produktion gekennzeichnet sind, wie die rheumatoide Arthritis, könnten demnach die Risiken einer TNFα-induzierten Apoptose durch die NFκB-Blockierung amplifiziert werden (Firestein, 2004). IKK-2 spielt auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung von B-Zellen, weswegen eine Inhibition von IKK-2 signifikante Einflüsse auf die Antikörper-Produktion, die Bildung von germinalen Zentren und der Reifung von lymphoiden Geweben haben könnte (Pasparakis, et al., 2002).

Diese Beteiligung an vielen wichtigen Immunprozessen macht die Inhibition von NFκB für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis schwierig und es ist die Frage inwieweit dabei die Vorteile die Nachteile überwiegen. Eine Möglichkeit die Nebeneffekte zumindest teilweise zu umgehen wäre es, die NFκB Aktivität zu modulieren statt sie ganz zu blockieren.

Im Vergleich dazu ist TAK1 als therapeutisches Ziel insofern vorteilhaft, als dass nicht alle NFκB-abhängigen Prozesse durch TAK1 vermittelt werden. Z.B. ist TAK1 zwar an der B-Zell-Rezeptor vermittelten Aktivierung von NFκB beteiligt (Shinohara, et al., 2005; Sun, et al., 2004), aber in primären B-Zellen für die NFκB-Aktivierung entbehrlich (Sato, et al., 2005). So wird über TAK1 eine Zelltyp-spezifische NFκB-Inhibition erreicht. Darüberhinaus können über TAK1 nicht nur NFκB-abhängige Signalwege, sondern zusätzlich die MAPK-Signalwege wie p38 und JNK beeinflusst werden, was den Einfluss und das Wirkungsspektrum einer anti-TAK1 Strategie deutlich gegenüber der Inhibition der einzelnen Kinasen oder NFκB erhöht. Gleichzeitig ist dies jedoch auch risikobehaftet, da gerade durch eine Beteiligung an vielen verschiedenen Signalwegen auch das Risiko von amplifizierten Nebenwirkungen entsteht. Diese müssen bei einer TAK1 basierten Strategie ebenso abgewogen und untersucht werden, wie es für NFκB und p38 der Fall ist.

p38 ist eine MAPK, die an vielen inflammatorischen Prozessen beteiligt ist und in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis eine Rolle spielt. Genau aus diesen Gründen stellt auch die Inhibition von p38 ein vielversprechendes, therapeutisches Ziel dar. Verschiedene p38 Inhibitoren haben sich als effizient bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis im Tiermodell

erwiesen (Kumar, et al., 2003) und befinden sich bereits in pre-klinischen Testphasen. Dabei zeigten die meisten der getesteten Inhibitoren Nebeneffekte, wie Ausschlag, Infektionen und gastrointestinale Intoleranz, weswegen weitere Testphasen häufig eingestellt wurden (Schindler, et al., 2007).

Eine andere Strategie beinhaltet die Verwendung von kleinen Molekülinhibitoren („small molecule inhibitors“) für p38, die bei oraler Anwendung eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen. Diese zeigten vielversprechende Ergebnisse in verschiedenen Tiermodellen der rheumatoiden Arthritis, wobei sie sowohl anti-inflammatorische Effekte als auch eine verminderte Gelenkschädigung zur Folge hatten (Sweeney, et al., 2004). Die Verwendung von kleinen Molekülinhibitoren für TAK1 könnte ebenso eine Alternative zu der siRNA basierten Inhibierung darstellen. Dabei tritt jedoch bei der Verwendung von kleinen Molekülinhibitoren von verschiedenen Kinasen und regulatorischen Proteinen das Problem der Spezifität auf. Es ist schwer, wirklich selektive Inhibitoren zu entwickeln, da viele an ATP-Bindungsstellen mit signifikanter Homologie binden. Dabei ist die Untersuchung der Spezifität für alle möglichen ATP-Bindungsstellen sowie für andere ATP- und Substrat-spezifischen Bindungsstellen genauso problematisch (Firestein, 2004).

4.3 Therapie der rheumatoiden Arthritis mit Hilfe einer anti-TAK1 Strategie

Die Behandlung von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis mit einer siRNA gegen TAK1 zeigte gute, therapeutische Effekte auf den Verlauf und den Schweregrad der Arthritis, wobei Pfotenschwellung, Arthritiswert und Inzidenz dramatisch gegenüber den Kontrollen reduziert werden konnten (vgl. 3.2.2, S.67). Diese Ergebnisse konnten in mehreren voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert werden und zeigen zum ersten Mal *in vivo*, dass TAK1 durch seine Schlüsselposition in verschiedenen pro-inflammatorischen Signalwegen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis spielt und damit ein vielversprechendes, neues Ziel für eine Behandlung der rheumatoiden Arthritis darstellen könnte.

4.3.1 Kurative Behandlung von Arthritis im Tiermodell

Viele Versuchsansätze auf der Suche nach neuen Therapien und Zielen zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis beruhen auf einer präventiven Behandlung, bei der eine Applikation des Therapeutikums vor der klinischen Manifestation der Krankheit erfolgt. Unter diesen Bedingungen zeigen viele der getesteten Agenzien eine gute Wirkung und verhindern oder verzögern den Einsatz der Arthritis. Unter therapeutischen Bedingungen, d.h. nach dem Einsatz der Arthritis, kann der scheinbar anti-rheumatische Effekt in den meisten Fällen jedoch nicht bestätigt werden (unter anderem Sabino, et al., 1999; Ranges, et al., 1985; Mori, et al., 1996). Ein präventives Modell lässt also meist keine Aussage über die Effektivität der Behandlung in einer etablierten Arthritis zu, da sich die zellulären und inflammatorischen Bedingungen vor und nach Einsatz der Arthritis natürlich stark verändern. Der Erfolg einer präventiven Behandlung impliziert deshalb keineswegs einen erfolgreichen, therapeutischen Einsatz in einer etablierten Arthritis. In der Praxis sind präventive Behandlungen im Falle der rheumatoiden Arthritis ebenfalls nicht durchführbar, da meist erst nach dem Einsetzen der Krankheit durch

die auftretenden Symptome eine Diagnose erfolgt und aufgrund dieser dann entsprechende Behandlungen folgen.

Vor diesem Hintergrund unterstreicht der in dieser Arbeit verwendete kurative Versuchsansatz, bei dem die Behandlung erst nach dem Einsatz der klinischen Manifestation der Krankheit erfolgte, die therapeutische Effizienz der Inhibierung von TAK1 auf die rheumatoide Arthritis. Dabei konnte die Entzündungsreaktion im Gelenk durch die Behandlung nicht nur gestoppt, sondern auch gemildert werden, was die Inhibition von TAK1 eine vielversprechendes Ziel zur Therapie der rheumatoiden Arthritis macht.

4.3.2 T-Zellen als Effektoren der siTAK1 Therapie

Bei der Aufklärung zellulärer und molekularer Mechanismen lag der Fokus der Untersuchungen auf der Milz, da dort eine signifikante Aufnahme der Liposomen-vermittelten systemischen siRNA erfolgt (Sorensen, et al., 2003). Die Aufnahme wird durch die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Lipoplexe, die mit einer Carrier-DNA komplexiert sind, deutlich gegenüber einer nur Liposomen-vermittelten siRNA-Gabe erhöht, wie durch Khoury et al. 2006 gezeigt werden konnte. Auch in der vorliegenden Studie wurde die TAK1-Expression in der Milz durch die siTAK1-Behandlung gegenüber den Kontrollen reduziert (Abbildung 3-23, S.85). Die Milz ist ein in den Blutkreislauf eingeschaltetes, peripheres Lymphorgan, weswegen die verstärkte Aufnahme der siRNA durch dieses Organ nach der systemischen Applikation nicht verwunderlich ist. Interessanterweise jedoch konnten durch die Untersuchung verschiedener, aus der Milz isolierter Zelltypen die T-Zellen als Zielzellen der siTAK1 Behandlung identifiziert werden, wobei hauptsächlich zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen (Abbildung 3-25, S.87) betroffen waren. Hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der TAK1-Expression auf mRNA-Ebene sowie die Inhibierung der Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-6 und TNF α als auch eine erhöhte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (Abbildung 3-26, S.89).

Diese Befunde waren insofern erstaunlich, als dass aufgrund vorangegangener Studien von Khoury et al. 2006 ursprünglich angenommen wurde, dass hauptsächlich Makrophagen von den siRNA-Lipoplexen *in vivo* betroffen sein würden und so davon ausgegangen wurde, dass die zuvor beobachteten Veränderungen der Zytokinexpression in der Milz auf die verminderte Sekretion durch Makrophagen zurückzuführen sein könnte. Dies konnte jedoch bei der Analyse isolierter Makrophagen aus der Milz siTAK1-behandelter Mäuse nicht bestätigt werden. Hier war weder eine Reduktion der TAK1-Expression (Abbildung 3-25, S.87), noch eine Veränderung der Zytokin-Expression (nicht dargestellt) nachweisbar, weswegen die Makrophagen als direkte Zielzellen der siRNA-Lipoplexe in der Milz ausgeschlossen wurden. Stattdessen wurden die T-Zellen als Ziele der siRNA-Lipoplexe in der Milz identifiziert. In diesem Zusammenhang konnte erstaunlicherweise auch gezeigt werden, dass ebenfalls die zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen der Lymphknoten von der Behandlung betroffen sind. Auch hier zeigte sich eine Reduktion der TAK1-Expression auf mRNA-Ebene (Abbildung 3-27, S.91) sowie eine reduzierte Expression der Zytokine IFN γ und TNF α (Abbildung 3-28, S.92). Die T-Zellen sind also die maßgeblichen Effektoren der siTAK1-Behandlung in den peripheren Lymphorganen und der beobachtete, therapeutische Effekt ist damit auf die Modulation der Produktion der T-Zellzytokine IFN γ , TNF α , IL-6 und IL-10 zurückzuführen.

T-Zellen als Zielzellen der siTAK1-Behandlung sind unter verschiedenen Gesichtspunkten sehr interessant. In einem klassischen Paradigma der rheumatoiden Arthritis bezüglich der Pathologie der Arthritis werden die T-Zellen als maßgeblich für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Krankheit postuliert (Mosmann, et al., 1986). Diese Schlüsselfunktion wird auch durch die Tatsache gestärkt, dass die Kollagen-induzierte Arthritis als experimentelles Modell für die humane Erkrankung T-Zell vermittelt ist (Fournier, 2005; Doncarli, et al., 1997). Die Entdeckung der neuen Th17-Zellpopulation, die direkt in die Pathogenese der Krankheit involviert sind, rückte die T-Zellen wieder in den Vordergrund (Lubberts, et al., 2005). Viele derzeitige Therapieansätze versuchen die Aktivität der T-Zellen zu beeinflussen, jedoch mit meist weniger guten Erfolgen, wie Ansätze mit Cyclosporin, CD4- und CD52-spezifischen Antikörpern gezeigt haben (Keystone, 2003). Deshalb ist es umso interessanter, dass durch die Inhibition eines Signalmoleküls wie TAK1 in den T-Zellen, diese so entscheidend in ihren krankheitsmodifizierenden Aktivitäten eingeschränkt werden und dies offensichtlich einen neuen Ansatz bietet um die T-Zellen und ihre Effektorzytokine zu beeinflussen. So bietet das Targeting von TAK1 durch die siRNA zwei Vorteile: Zum einen werden durch die systemische Administration der Lipoplexe die peripheren Lymphorgane erreicht -die Hauptproduzenten der T-Lymphozyten-, in denen gezielt die T-Zellen von der Behandlung betroffen sind und zum anderen die offensichtlich wesentliche Rolle von TAK1 bei der Produktion der T-Zell-Effektorzytokine.

Die vorliegende Studie unterstützt demnach die Hypothese einer T-Zell vermittelten Krankheit, wobei auch hier gezeigt werden konnte, dass die T-Helferzellen in dieser Hinsicht eine wesentliche Rolle spielen. Welche Th-Subpopulation (Th1/Th2/Th17) dabei besonders von der TAK1-Inhibition betroffen ist, werden weitere Studien zeigen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass hauptsächlich Th1-Zellen betroffen sind, da diese IFN γ produzieren und die Inhibierung von TAK1 die IFN γ -Produktion reduziert. Dabei verändert die Inhibition von TAK1 jedoch ganz offensichtlich nicht die Antigen-spezifische Proliferation der T-Zellen oder beeinflusst das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen. Aus diesem Grund muss angenommen werden, dass die IFN γ -Produktion in den T-Zellen TAK1-abhängig erfolgt.

Eine Rolle von TAK1 in der adaptiven Immunität und damit in T-Zellen ist bereits in der Literatur beschrieben (Sato, et al., 2005). Studien an Jurkat T-Zellen und DT40 B-Zellen zeigen, dass TAK1 an der T-Zell-Rezeptor (TCR)- und B-Zell-Rezeptor (BCR)-vermittelten Aktivierung von NF κ B beteiligt ist (Shinohara, et al., 2005; Sun, et al., 2004). In reifen Thymozyten ist TAK1 für die T-Zell Rezeptor-vermittelten zellulären Immunantworten und die Aktivierung von NF κ B und JNK notwendig, wohingegen in Effektor-T-Zellen die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Produktion von Zytokinen durch die Abwesenheit von TAK1 nicht beeinflusst wird und nur eine geringe Verminderung der JNK-Aktivität zu verzeichnen ist (Wan, et al., 2006). Diese Beobachtungen stehen insofern im Widerspruch zu der vorliegenden Arbeit, als dass hier ganz offensichtlich die Effektor-T-Zellen durch die Inhibierung von TAK1 in ihrer Fähigkeit der Zytokinproduktion beeinträchtigt werden. Eine Analyse der beteiligten Signalwege und mögliche Mechanismen sollten diese Diskrepanz jedoch aufklären können.

Weiterhin scheint TAK1 mit der Reifung von Thymozyten zu interferieren. Dies konnte in einer Studie von Liu et al. 2006 gezeigt werden. Dabei führte die Inhibierung von TAK1 zu

einer gestörten Entwicklung, wobei die T-Zellen die Entwicklung von dem doppel-positiven (DP) Stadium ($CD4^+CD8^+$) in das single-positive (SP) Stadium ($CD4^+$ oder $CD8^+$) nicht überleben. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion von naiven T-Zellen in den peripheren Geweben (Liu, et al., 2006). Eine derartige Beobachtung konnte in der vorliegenden Studie nicht gemacht werden. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Anzahl der peripheren $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen in der Milz zwischen den siCTR und den siTAK1 behandelten Mäusen, was auf eine mangelnde Aufnahme der siRNA gegen TAK1 durch den Thymus oder durch die Thymozyten an sich zurückzuführen sein konnte. Um diesbezüglich mehr Klarheit zu bekommen sollten in Folgestudien Thymus und Thymozyten eingehender untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt der im Zusammenhang von TAK1 und T-Zellen nicht außer Acht gelassen werden sollte ist, dass TAK1 eine wesentliche Rolle bei der Bildung von regulatorischen T-Zellen spielt, wobei die Inhibierung von TAK1 die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen beeinträchtigt (Sato, et al., 2006). Da regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Selbsttoleranz und damit bei der Entstehung von Autoimmunerkrankheiten haben, sollte der Einfluss der siRNA-basierten Inhibierung von TAK1 im Arthritismodell auf die regulatorischen T-Zellen in weiteren Studien untersucht werden.

Eine neue Beobachtung ist, dass TAK1 auch mit der Zytokinexpression in zytotoxischen T-Zellen zu interferieren scheint. Diese sind die Hauptproduzenten von $IFN\gamma$, die durch die Inhibierung von TAK1 deutlich reduziert wurde. Dies zeigt eindrucksvoll, dass TAK1 an wesentlich mehr Prozessen in verschiedenen Zelltypen beteiligt ist und die zytotoxischen T-Zellen dazu gezählt werden müssen.

4.3.3 Die Inhibition von TAK1 moduliert die Zytokin-Expression in rheumatoider Arthritis

Wie bereits erwähnt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibierung von TAK1 mit einer Modulation wichtiger, in die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis involvierter Zytokine einhergeht. Eine Reduktion von $IFN\gamma$, IL-6, IL-1 β und TNF α sowie eine Induktion der Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 konnte dabei durch verschiedene Methoden wie ELISA, intrazelluläre Zytokinfärbung und quantitativer-PCR nachgewiesen werden.

Obgleich die Hauptproduzenten von IL-1 β , IL-6 und TNF α Makrophagen sind, tragen die T-Zellen auch wesentlich zu deren Expression bei. Ein sekundärer Effekt auf die Makrophagen, der durch die Inhibierung von TAK1 in den T-Zellen ausgelöst wird und so deren Zytokinproduktion beeinflusst ist eher unwahrscheinlich, da Analysen der Zytokinproduktion durch die Makrophagen keine Veränderungen zwischen der siCTR- und der siTAK1-Gruppe zeigte (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund scheint TAK1 in den T-Zellen in die Produktion der genannten Zytokine direkt involviert zu sein. Die direkte Beeinflussung der Produktion mehrerer Zytokine durch die Inhibition von TAK1 stellt einen weiteren wesentlichen Vorteil der Strategie eine Signalkinase, die ziemlich weit oben in den Signalwegen angesiedelt ist, als Ziel zu verwenden, dar. Der therapeutische Effekt der siTAK1-Behandlung ist demnach auch hauptsächlich auf die Modulation dieser Zytokine zurückzuführen.

Die Schlüsselrolle von TNF α in der rheumatoiden Arthritis ist spätestens seit der sehr erfolgreichen Anwendung von TNF α -Blockern in der therapeutischen Behandlung von Arthritis eine unumstrittene Tatsache. Die Inhibierung von TAK1 führt ebenfalls zu einer Reduktion der TNF α -Produktion im Serum, der Milz, den Gelenken und den Lymphknoten. In den Lymphknoten und in der Milz ist dies wie im Abschnitt zuvor beschrieben auf die T-Zellen, insbesondere die T-Helferzellen, zurückzuführen. Hier zeigte sich erstaunlicherweise, dass die Reduktion der TNF α Produktion in den T-Helferzellen durch die TAK1 Inhibition in gleicher Intensität erfolgte, wie durch einen zur Therapie bereits eingesetzten TNF α -Blocker mit dem Namen Enbrel (vgl. Abbildung 3-26, S.89) (Fleischmann, et al., 2002). Dies lässt darauf schließen, dass ein wesentlicher Teil der beobachteten Effekte der TAK1-Inhibierung auf die Kollagen-induzierte Arthritis durch die Reduktion der TNF α Produktion zurückzuführen ist. Eine Behandlung von Arthritis durch die Blockierung von TNF α geht mit der Reduktion von IL-6 im Serum einher (Maini, et al., 2000). Eine lokale Inhibierung von IL-6 konnte auch in der Studie von Khoury et al. 2006 nach der Behandlung von Kollagen-induzierter Arthritis mit einer siRNA gegen TNF α gezeigt werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass auch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Verminderung der IL-6-Produktion zumindest teilweise in den Gelenken und im Serum auf die Inhibierung von TNF α zurückgeführt werden kann. Dennoch erscheint die Inhibierung von IL-6 durch die siTAK1-Behandlung umfassender zu sein als in den erwähnten Studien. Sie kann nicht nur lokal in den Gelenken bzw. den Knieumgebenden Medien gezeigt werden, sondern auch in der Milz. Inwieweit auch dort eine Verbindung zwischen der Reduktion von TNF α und IL-6 besteht ist unklar, erscheint aber durchaus wahrscheinlich. Eine Beteiligung durch die Inhibierung von TAK1 an der verminderten IL-6-Produktion ist dabei jedoch nicht auszuschließen, könnte allerdings auch auf die gesteigerte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zurückzuführen sein. Von Hempel et al. konnte 1995 gezeigt werden, dass IL-10 die Produktion von IL-6 durch T-Zellen direkt inhibiert (Hempel, et al., 1995). Im Zusammenhang der verminderten lokalen IL-6-Produktion könnte diese auch auf eine verminderte Sekretion durch die Synoviozyten erfolgen. Hammaker et al. konnten in ihren Studien 2007 zeigen, dass die Inhibierung von TAK1 in Synoviozyten zu einer verminderten IL-6 Produktion führt. Durch die Tatsache, dass die siRNA-Lipoplexe stärker das rheumatoide Gelenk als normale Gelenke erreichen und dass noch nicht bekannt ist, welche Zielzellen die siRNA-Behandlung im arthritischen Gelenk hat, sollte diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden. Generell ist die Produktion von IL-6 mit lokalen und systemischen Symptomen der rheumatoiden Arthritis assoziiert und die IL-6 Mengen in den Patienten korrelieren mit den klinischen Symptomen und dem Schweregrad der Krankheit (Cronstein, 2007). Die wichtige Funktion von IL-6 bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis wird auch dadurch belegt, dass IL-6 für die Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis benötigt wird (Alonzi, et al., 1998; Sasai, et al., 1999). Derzeitige klinische Tests der Phase III laufen mit einem IL-6 Rezeptor-spezifischen Antikörper namens Tocilizumab und lassen auf eine nahezu gleiche Effektivität wie TNF α -gerichtete Ansätze schließen (McInnes, et al., 2007; Wendling, et al., 1993; Smolen, et al., 2003).

Interessant ist jedoch auch die bereits erwähnte Induktion der Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Dieses wird im Serum, der Milz und der Leber in der si-TAK1 behandelten Gruppe hochreguliert, während es in den Gelenken und den Lymphknoten deutlich niedriger exprimiert wird als in den Kontroll-Gruppen. Diese gegenteilige Regulation

zeigt sich auch später in den Analysen auf Zellebene. In T-Helferzellen wird die Produktion von IL-10 gesteigert, während sie in den zytotoxischen T-Zellen reduziert wird. Erstaunlicherweise kann derselbe Effekt in diesen Zellen durch die Behandlung mit dem TNF α -Blocker Enbrel beobachtet werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die IL-10 Produktion durch die T-Zellen eng mit der Inhibierung von TNF α verknüpft ist. TNF α ist ein Th1-Zytokin, während IL-10 ein Th2-Zytokin darstellt. Da sich die verschiedenen T-Helferzellpopulationen über die Sekretion charakteristischer Zytokine gegenseitig regulieren, liegt die Vermutung nahe, dass durch die reduzierte TNF α Sekretion durch Th1-Zellen die IL-10-Produktion von Th2-Zellen gefördert wird oder *vice versa*. Jedenfalls ist die erhöhte Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 vorteilhaft bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis, weswegen es auch die Grundlage für verschiedene Therapieansätze bietet. Die *in vivo*-Administration von IL-10 milderte die Kollagen-induzierte Arthritis in Mäusen (Walmsley, et al., 1996). In einem klinischen Phase I Versuch mit rekombinantem, humanen IL-10 konnte ebenfalls eine Besserung der Krankheitsaktivität beobachtet werden (Maini, et al., 1997). Studien über die Administration von IL-10 produzierenden mesenchymalen Stammzellen in Mäuse mit Kollagen-induzierter Arthritis zeigten jedoch recht widersprüchliche Ergebnisse (Choi, et al., 2008; Djouad, et al., 2005).

Bezüglich der IFN γ -Beteiligung an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis gibt es sehr gegenteilige Berichte: zum einen ist IFN γ kaum im rheumatoiden Synovium nachweisbar, monoklonale Antikörper gegen IFN γ zeigen wenig Effizienz und IFN γ scheint einerseits in der Lage eine etablierte Arthritis in Mäusen zu mildern, fördert aber andererseits das Auftreten von Arthritis in gesunden Mäusen (Manoury-Schwartz B, 1997; Boissier MC, 1995). Nichtsdestotrotz wird generell von einer pathologischen Beteiligung von IFN γ an der rheumatoiden Arthritis ausgegangen. Die Kollagen-induzierte Arthritis ist wie bereits erwähnt Th1-vermittelt und IFN γ ist ein wesentliches Effektorzytokin der Th1-Zellen, welches ihre Proliferation und Differenzierung fördert. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Reduktion der IFN γ -Produktion durch die Inhibierung von TAK1 geht nicht mit einer verminderten Th1-Antwort einher, weswegen von einer direkten Beteiligung von TAK1 an der IFN γ -Produktion in T-Helferzellen ausgegangen wird.

4.4 TAK1 und die Geweberegeneration

Die Schlüsselposition von TAK1 sowohl in inflammatorischen Signalwegen als auch in Differenzierungsprozessen macht TAK1 zu einem attraktiven Ziel für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis. Bisherige Therapien konzentrieren sich hauptsächlich auf die Eindämmung und Kontrolle der Inflammation und nur wenige therapeutische Ansätze beschäftigen sich mit der Beeinflussung der Gewebeheilung. Viele Patienten haben jedoch bereits einen Gelenkschaden durch eine vorangeschrittene Krankheit erlitten, weswegen auch die Regeneration von skeletalem Gewebe ein wichtiges therapeutisches Ziel in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis ist (De Bari, et al., 2006).

Mesenchymale Vorläuferzellen sind in die Gewebebildung involviert und im rheumatoiden Synovium vorhanden, wo sie beim Remodeling des geschädigten Knorpels eine Rolle spielen. Die hohen Konzentrationen von IL-1 β und TNF α im rheumatoiden Synovium beeinflussen dabei das Differenzierungspotential der Vorläuferzellen (Murakami, et al., 2000) und verhin-

dern so neben anderen in die Geweberegeneration involvierten Prozessen, die Reparatur der entstehenden Knorpelschäden durch die mesenchymalen Progenitorzellen (Alsalameh, et al., 2004). In vorigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von TAK1 durch die Expression einer dominant-negativen Form (dnTAK1) in der mesenchymalen Progenitorzelllinie C3H10T½ mit einer gesteigerten BMP2-induzierten Osteogenese einhergeht, während die Expression der Wildtyp-Form von TAK1 diese inhibiert (Hoffmann, et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die lentivirale Expression von dnTAK1 gezeigt werden, dass TAK1 in den mesenchymalen Vorläuferzellen nicht nur in die Weiterleitung von Differenzierungsprozessen involviert ist, sondern auch mit den IL1β-induzierten Signalwegen p38, JNK und NFκB interferiert (3.1.1, S.59). Diese Ergebnisse für mesenchymale Progenitorzellen könnten die Grundlage für weitere, gentherapeutische *in vivo*-Studien darstellen, welche die Administration lentiviral modifizierter, mesenchymaler Stammzellen, die eine inaktive Form von TAK1 exprimieren, in Mäuse mit Kollagen-induzierter Arthritis umfassen könnte. Dabei sind mesenchymale Stammzellen nicht nur in der Lage zum Ort der Entzündung zu migrieren, sondern besitzen auch immunsuppressive Eigenschaften *in vivo* (Rasmusson, et al., 2005; Aggarwal, et al., 2005; Glennie, et al., 2005). Die Expression einer inaktiven Form von TAK1 könnte in diesem Zusammenhang verstärkt die Differenzierungseigenschaften der Stammzellen in Knochen- und Knorpelgewebe fördern und damit der Gelenkdegradation in der rheumatoiden Arthritis entgegenwirken sowie die Weiterleitung inflammatorischer Signalwege im Gelenk beeinflussen und hemmen. Die mesenchymalen Stammzellen wären aufgrund ihrer Differenzierungseigenschaften und ihrer immunsuppressiven Aktivitäten ebenfalls von Vorteil.

Im Hinblick auf die Geweberegeneration fördert die Inhibierung von TAK1 nicht nur die BMP2-abhängige osteogene Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen, sondern ist auch in die Osteoklastogenese involviert (Hoffmann, et al., 2005; Mizukami, et al., 2002). RANKL (Rezeptor-Aktivator von NFκB Ligand) interagiert mit seinem Rezeptor RANK, der auf Osteoklasten-Vorläufern und reifen Osteoklasten exprimiert wird, und fördert dadurch die Differenzierung, das Überleben und die Fähigkeit der Knochenresorption von Osteoklasten (Hofbauer, et al., 2000; Suda, et al., 1999). Unter rheumatischen Bedingungen wird die Gelenkdegradation unter anderem durch eine stark erhöhte Osteoklastenaktivität vermittelt (Schett, 2007). Da TAK1 eine zentrale Rolle bei der Signalweiterleitung des RANKL-RANK spielt, könnte eine Inhibierung von TAK1 mit einer verminderten Osteoklastogenese einhergehen und so die Gewebedegradation im rheumatischen Gelenk inhibieren (Mizukami, et al., 2002; Huang, et al., 2006).

Mit der Inhibierung von TAK1 könnte demnach beides, die Inflammation als auch die Gewebedegradation bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Geweberegeneration vermindert werden. Dies ist insofern neu, als dass die drei wichtigsten, therapeutischen Ziele in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis durch nur ein therapeutisches Ziel beeinflusst werden könnten. Die Beeinflussung der Inflammation bei der rheumatoiden Arthritis durch die Inhibierung von TAK1 konnte in der vorliegenden Studie bereits *in vivo* gezeigt werden. Inwieweit der Prozess der Gelenkdegradation ebenfalls durch die Inhibition von TAK1 vermindert werden kann und vielleicht sogar regenerative Einflüsse auf Knochen und Knorpelgewebe im rheumatischen Gelenk hat wird derzeit von einer Arbeitsgruppe um Georg Schett an Gewebeproben

von Pfoten und Knien aus den siTAK1 behandelten Mäusen untersucht. Erste Ergebnisse zeigen dabei eine deutliche Reduktion des entzündeten Bereichs im Gelenk und deuten auf eine reduzierte Gewebedegradation hin.

Ein lokaler Effekt im Kniegelenk durch die systemische Administration der siRNA gegen TAK1 ist hierbei durchaus denkbar. In vorherigen Studien mit der gleichen Applikationsstrategie für die siRNAs, das auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, konnten Khoury et al. zeigen, dass bei der Verwendung einer siRNA gegen TNF α die TNF α -Produktion lokal im Gelenk deutlich reduziert war. Hierbei ist die siRNA-Aktivität in entzündeten Gelenken arthritischer Mäuse sogar deutlich gegenüber normalen Gelenken erhöht, was wahrscheinlich auf die Neovaskularisierung in den arthritischen Gelenken zurückzuführen ist (Khoury, et al., 2006).

4.5 Hat die TAK1-Therapie zur Behandlung rheumatoider Arthritis eine Realisierungschance bei Menschen?

Die Behandlung von Kollagen-induzierter Arthritis durch die siRNA-basierte Inhibierung von TAK1 führte zu einem deutlichen therapeutischen Effekt, der durch eine reduzierte Entzündungsreaktion in den Gelenken gekennzeichnet ist und auf zellulärer Ebene hauptsächlich über zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen vermittelt wird. Dabei ist Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch die T-Zellen infolge der Inhibierung von TAK1 deutlich reduziert und ist wahrscheinlich für den therapeutischen Effekt der siTAK1-Behandlung verantwortlich.

Neben der bereits diskutierten Verwendung von siRNAs als gentherapeutische Strategie zur Behandlung von rheumatoider Arthritis stellt sich auch die Frage, inwiefern eine Inhibition von TAK1 eine therapeutisch anwendbare Alternative zu derzeitigen Therapien darstellt. Obwohl in dem Kollagen-induzierten Arthritismodell deutliche therapeutische Erfolge gezeigt werden konnten und die Arthritis durch die Inhibierung von TAK1 stark vermindert wird, gibt es bezüglich einer klinischen Anwendung verschiedene Aspekte die zu berücksichtigen sind und die vor allem auf die biologische Rolle von TAK1 zurückzuführen sind.

Die Krankheit konnte in dieser Studie durch die TAK1 Inhibition nicht geheilt werden und das Einstellen der Behandlung resultiert in einem Wiederauftreten der Krankheit, wie die durchgeführten Experimente an dem Kollagen-induzierten Arthritismodell gezeigt haben. Deshalb wäre für einen dauerhaften, therapeutischen Effekt eine wiederholte, systemische Zufuhr nötig und das über einen langen Zeitraum, da die Arthritis für Jahrzehnte, wenn nicht ein ganzes Leben andauern kann und eine langzeitliche Behandlung deshalb unvermeidlich ist. Dies würde einerseits einen erhöhten Kostenfaktor implizieren und könnte andererseits auch aufgrund der möglicherweise auftretenden Nebenwirkungen auf lange Sicht gesehen ein Gesundheitsrisiko darstellen. Um die wiederholte systemische Applikation zu umgehen, würde sich eine Virus-vermittelte und damit stabile Inhibition von TAK1 über die Expression von shRNAs („small hairpin“ RNAs) anbieten, die dann lokal ins Gelenk injiziert werden könnten. Dabei stellt sich natürlich die Frage, ob eine lokale Inhibierung von TAK1 ähnliche Effekte wie die systemische Inhibition hat, da die beobachteten Effekte auf die Kollagen-induzierte Arthritis durch die systemische, siRNA vermittelte Inhibierung von TAK1 in der vorliegen-

den Arbeit hauptsächlich auf die Beeinflussung der T-Zellen in der Milz und den Lymphknoten zurückgeführt werden kann. Der Ansatz einer lokalen Inhibierung von TAK1 durch die Applikation in das Kniegelenk müsste in weiteren *in vivo*-Studien an einem Kollagen-induzierten Arthritismodell evaluiert werden. Dies könnte auch über die erwähnte Inaktivierung von TAK1 durch die lentivirale Expression einer dominant-negativen Form von TAK1 erfolgen. Eine lokale Injektion ist jedoch auf die klinische Anwendung übertragen ebenfalls schwierig durchführbar. Jede Strategie hat seine ganz eigenen Vor- und Nachteile und die Pro und Kontra müssen dabei bei der Anwendung in Tiermodellen abgewägt werden.

Insgesamt konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibierung von TAK1 eine neue, erfolgsversprechende Strategie zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis ist, da hier auf der Ebene der Signalweiterleitung in das inflammatorische Geschehen eingegriffen wird. Damit eröffnet sie eine Alternative zu Zytokin-basierten Therapien und bietet einige Vorteile. Zum einen können durch die Inhibierung einer in den Signalwegen weit oben gelegenen Kinase wie TAK1 mehrere Signalwege, die an der Inflammation beteiligt sind, beeinflusst werden wie die MAPK-Signalwege p38 und JNK als auch der NF κ B-Signalweg. Die dadurch bedingte Beeinflussung der Produktion verschiedener, in die Pathogenese der Arthritis involvierter Zytokine und Matrix-abbauenden Proteasen eröffnet ein breiteres Wirkungsspektrum auf verschiedenen Ebenen der Krankheit, als es eine auf einem Zytokin-basierende Therapie tut. Die beschriebenen Nebeneffekte, wie das erhöhte Infektionsrisiko und der Kostenaufwand, die eine anti-TAK1 Therapie implizieren könnte, wären mit denen einer TNF α -basierten Therapie vergleichbar, wobei jedoch auf diese Art und Weise auch Patienten, die nicht auf eine anti-TNF α Therapie ansprechen, behandelt werden könnten. Es bleiben noch viele Fragen bezüglich des Wirkungsmechanismus der TAK1 Inhibition auf die rheumatoide Arthritis offen. Es konnte zwar gezeigt werden, dass maßgeblich die zytotoxischen T-Zellen, sowie die T-Helferzellen der Milz betroffen sind und die Expression verschiedener, pro-inflammatorischer Zytokine deutlich reduziert wurde, aber welche Signalwege in den T-Zellen betroffen sind, welche Zelltypen im Gelenk durch die TAK1 Inhibierung betroffen werden und ob die Inhibierung von TAK1 auch zu einer Verminderung der Gelenkdegradation bzw. einer Regeneration von Knochen und Knorpel im Gelenk führen kann, wird Gegenstand weiterer Studien sein.

5 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronische Autoimmunerkrankung in deren Verlauf es zu der Entzündung und Degradation mehrerer Gelenke (Polyarthrit) kommt. Die Krankheit betrifft 1% der Bevölkerung und ist durch Invalidität und erhöhter Mortalität gekennzeichnet. Limitierungen derzeitiger Therapien, wie z.B. den TNF α -Blockern, machen die Suche nach neuen Therapiestrategien zu einem wichtigen Ziel in der Rheumaforschung.

Neben den klassischen Zytokin-basierten Ansätzen wurde in dieser Arbeit die Hypothese postuliert und untersucht, dass auch Faktoren der Signaltransduktion zur therapeutischen Intervention genutzt werden können. Die TGF- β -aktivierte-Kinase-1 (TAK1) ist eine MAP3K, die neben TGF- β und BMP vermittelten Differenzierungsprozessen auch mit den inflammatorischen IL-1-, TNF α - und LPS-vermittelten Signalwegen interferiert. Aktuelle Studien zeigen, dass TAK1 ein Schlüsselmolekül bei der Regulation von inflammatorischen Prozessen ist. Wir gingen daher davon aus, dass eine systemische anti-TAK1 Strategie möglicherweise einen neuen Weg für die therapeutische Behandlung der rheumatoiden Arthritis darstellen kann.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde erstmals der therapeutische Effekt einer systemischen siRNA vermittelten Inhibition von TAK1 *in vivo* in einem experimentellen und kurativen Modell der Kollagen-induzierten Arthritis in Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich eine sehr gute therapeutische Wirkung der anti-TAK1 Strategie, die mit stark verminderten Pfotenschwellungen, Arthritiswerten und Arthritisfrequenzen einherging und mit einer anti-TNF α Strategie vergleichbare Ergebnisse zeigte.

Im Verlauf der Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass der therapeutische Effekt maßgeblich auf die verminderte Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-6, IL-1 β und TNF α und der verstärkten Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zurückzuführen ist. Als maßgebliche Produzenten dieser Zytokine und Effektoren der anti-TAK1 Behandlung stellten sich nicht wie erwartet Makrophagen, sondern interessanterweise zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen der Milz und der Lymphknoten heraus.

siRNA basierte Therapien werden bereits klinisch für die Behandlung verschiedener Krankheiten wie der Makuladegeneration, Hepatitis B und C, Asthma, Diabetes und Krebs eingesetzt. Die Verwendung von siRNAs zur Therapie von rheumatoider Arthritis ist noch in der Entwicklungsphase, doch zeigt unter anderem die vorliegende Arbeit, dass sie eine bedeutende Alternative zu anderen, gentherapeutischen Strategien darstellen kann.

Insgesamt zeigt diese Arbeit erstmalig, dass über Signalmediatoren wie die MAP-Kinase Kinase TAK1 die Möglichkeit besteht in verschiedene Zelltypen und Signalwege einzugreifen und damit die Produktion mehrerer Zytokine zu beeinflussen. Durch eine ebenfalls wichtige Rolle von TAK1 in Differenzierungsprozessen und der Gewebedegradation könnte die anti-TAK1 Strategie ebenfalls auf der Ebene der Gewebedegradation und -regeneration vorteilhaft sein. TAK1 bietet, demnach ein potentiell, neues Ziel in der Behandlung von rheumatoider Arthritis.

6 Anhang

6.1 Geräte

Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5417R Heraeus Biofuge pico Heraeus Megafuge 1.0 R Sorvall RC5C
Mikroskope:	Leitz Labovert FS (Lichtmikroskop) mit Intas 3-Chip-Farb-Video-Kamera Zeiss Axiovert S100 (Fluoreszenzmikroskop) mit Leica Digitalkamera DC200
Elektrotransformationsapparatur:	Bio-Rad Gene Pulser
Geldokumentation:	INTAS Gel Imager mit Misubishi Thermo Digital Video Printer P93DW
PCR-Apparatur:	Applied Biosystems, GeneAMP PCR System 2400 Applied Biosystems, GeneAMP PCR System 9700 Biometra Thermocycler T-Personal 48
qPCR:	Light Cycler 480, Roche
Photometer:	Amersham pharmacia biotech Ultraspec [®] 3100 pro mit DPU-414 Thermal Printer
Sequenzierapparatur:	ABI Prism 310 Genetic Analyzer
Sterilbank:	Heraeus Lamin Air [®] HLB 2472
Zellkulturinkubator:	Heraeus CO ₂ -Auto-Zero Labotec Inkubator C200
Entwicklermaschine:	Agfa, Curix 60
FACS-Sorter:	FACS-LSR II, BD-Bioscience
ELISA-Reader:	Labsystems, Multiscan B-Kanal Photometer EX-405
Homogenisator:	MagN Lyser (Roche)
Luminometer:	Microlumat LB 96-W Mess-system Winglow 1t; EG&G Berthold
Elektrophoresekammer:	Horizon [™] 11-14 Horizontal Gel Electrophoresis System, Gibco BRL (Agarosegele) Biometra Electrophorese Minigel Twin G42 (SDS-Gele)
Netzgeräte:	Bio-Rad PowerPac 200 Bachhofer Laboratoriumsgeräte 7410 Reutlingen

6.2 Verbrauchsmaterialien

Glasgefäße:	Sarstedt-Reaktionsgefäße
Plastikgefäße:	Greiner
Zellkulturgefäße:	Nunc
Sterilfilter:	Millipore, Steritop, 0,22µm GPExpressmembran

Die übrigen eingesetzten Geräte und Materialien gehören zur Standard-Laboraausstattung und zeigen keinen relevanten Einfluss auf den Verlauf oder die Dokumentation von durchgeführten Experimenten.

6.3 Chemikalien und Enzyme

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, Bio-Rad, Boehringer, Fluka, GIBCO BRL, Merck, Pharmacia, Renner, Riedel-de-Haen, Roth, Seromed, Serva und Sigma verwendet.

Tabelle 6-1 | Verwendete Enzyme.

Enzym/Protein	Hersteller
GoTaq [®] Flexi DNA Polymerase	Promega
Herculase [®] Enhanced DNA Polymerase	Stratagene
M-MLV Reverse Transkriptase	Life Technologies Gibco BRL
PfuTurbo [®] DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Biolabs
Rnasin [®] Ribonuclease Inhibitor	Promega
T4 DNA-Ligase	Promega

6.4 Kits und Standards

Tabelle 6-2 | Verwendete Kits und Standards.

Produkt	Hersteller
High Pure PCR-Product Purification Kit	Roche
dNTPs	Amersham Biosciences
Ready-Mix (Sequenzierungskit)	Applied Biosystems
ECL [™] Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
ECL [™] - plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
Jetstar 2.0 Plasmid Maxiprep Kit	GENOMED
Jetstar 2.0 Plasmid Midiprep Kit	GENOMED
Jetstar 2.0 Plasmid Miniprep Kit	GENOMED
Complete Mini – Proteaseinhibitortabletten	Roche
GeneRuler [™] 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas
Prestained Protein MW-Standards, High Range	GibcoBRL [™]
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker, 3	MBI Fermentas
Oligo-(dT)12-18-Primern	0.5 µg/µl, GibcoBRL [®]
5fach RT-Puffer	GibcoBRL [®]
0.1 M DTT	GibcoBRL [®]
RNAasin [®]	RNAse-Inhibitor, 40 U/µl; Promega
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche
Lipofectamine2000	Invitrogen
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	Roche
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (Bradford)	BioRad

Produkt	Hersteller
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega
BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation and Permeabilization Kit	Becton Dickinson Biosciences
Luciferase Assay System	Promega

6.5 Oligonukleotidprimer

Die Oligonukleotidprimer wurden von den Firmen Operon und Fermentas bezogen.

Tabelle 6-3 | Verwendete murine Primer für RT-PCR und qPCR.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
GAPDH F	AAC TTTGGCATTGTGGAAGG	Nachweis GAPDH / Expressionsabgleich qPCR
GAPDH R	ACACATTGGGGGTAGGAACA	Nachweis GAPDH / Expressionsabgleich qPCR
HPRT F	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	Nachweis HPRT, RT-PCR
HPRT R	AAGTAGATGGCCACAGGACT	Nachweis HPRT, RT-PCR
TNFα F	CGTCAGCCGATTGCTATCT	Nachweis TNFα, qPCR
TNFα R	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG	Nachweis TNFα, qPCR
IFNγ F	ACTGGCAAAAGGATGGTGAC	Nachweis IFNγ, qPCR
IFNγ R	GACCTGTGGGTGTGTGACCT	Nachweis IFNγ, qPCR
IL-1β F	GCCCATCCTCTGTGACTCAT	Nachweis IL-1β, qPCR
IL-1β R	AGGCCACAGGTATTTTGTCTG	Nachweis IL-1β, qPCR
IL-6 F	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	Nachweis IL-6, qPCR
IL-6 R	CAGAATTGCCATTGCACAAC	Nachweis IL-6, qPCR
IL-10 F	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	Nachweis IL-10, qPCR
IL-10 R	TTTTCACAGGGGAGAAATCG	Nachweis IL-10, qPCR
TAK1 F	GTCATCAGAAGCCAACAGCA	Nachweis TAK1, qPCR
TAK1 R	ATGCAGCAAAGAGAGGCATT	Nachweis TAK1, qPCR
pLOX F	CTAGATGAGGAGACTGTGAGAG	Nachweis des Vektors pLOX
pLOX R	GTTAAGAATACCAGT- CAATCTTTCAC	Nachweis des Vektors pLOX
GFP F	CCATGCCCCGAAGGCTACGTCC	Nachweis GFP, RT-PCR
GFP R	GGACGTAGCCTTCGGGCATGG	Nachweis GFP, RT-PCR

6.6 Verwendete Plasmide und Vektorkarten

Tabelle 6-4 | Verwendete Plasmide.

Plasmid	Funktion	Herkunft
pLox	lentiviraler Expressionsvektor	von Pierre Corbeau aus Montpellier zur Verfügung gestellt
pNF- κ B luc	Reporterplasmid für NF κ B	Stratagene

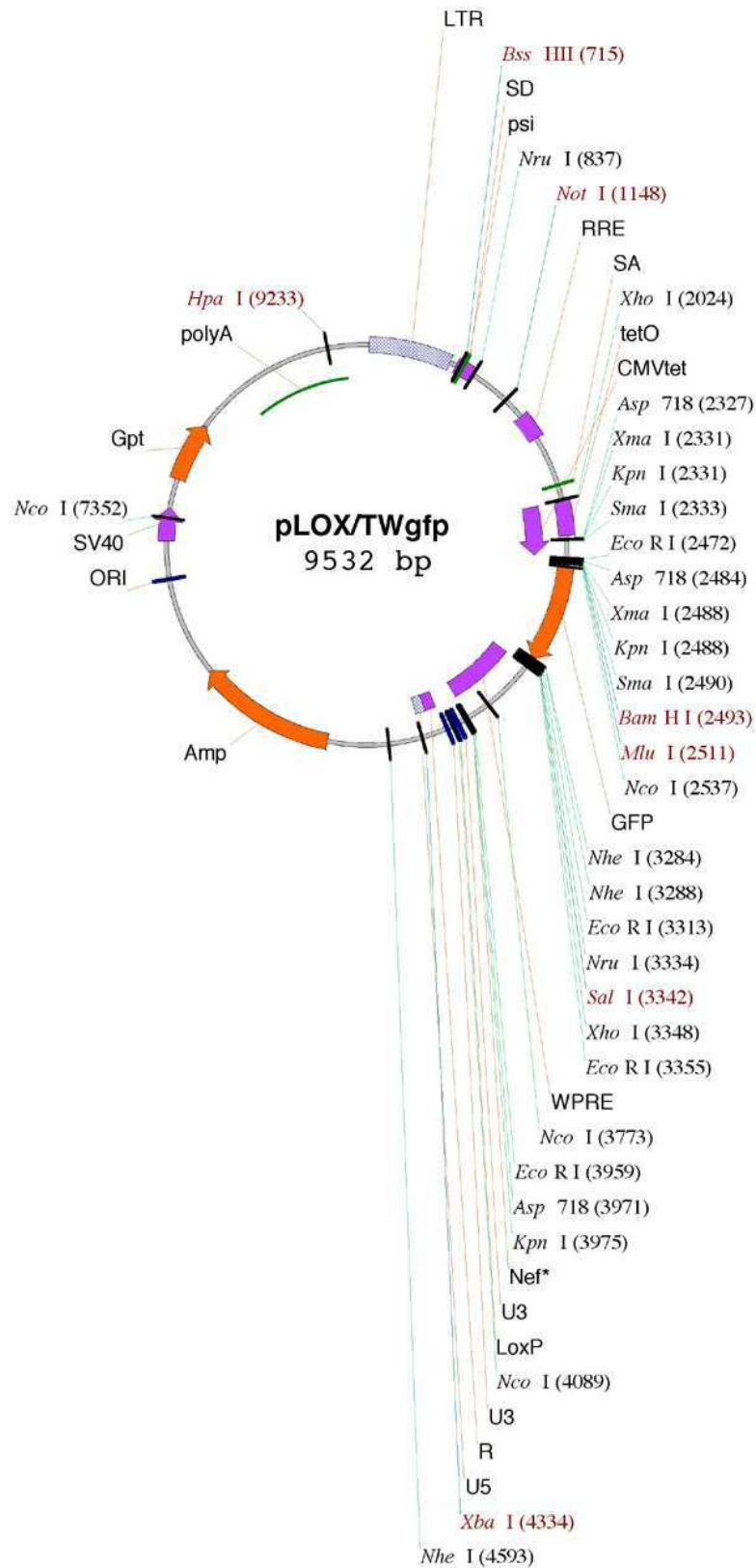


Abbildung 6-1 | Vektorkarte für pLOX.

6.7 Verwendete Computerprogramme / Datenbanken (Internet)

Adobe Photoshop CS2
 Corel Photo-Paint 11.0
 Corel Draw 11.0
 DNA-STAR 4.0
 Microsoft Excel 2007
 Microsoft Word 2007
 Microsoft Power Point 2007
 MVPilot 1.0 Zellkulturdokumentation
 WinCam 2.0
 DC Leica Viewer
 INTAS Gel Capture Software

Blast-search: www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast
 Medline: www4.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/medline.html
 Entrez nucleotide query: www3.ncbi.nlm.nih

6.8 Abkürzungsverzeichnis

λDNA	Lambda-DNA	BMP	‚bone morphogenetic protein‘
µg	Mikrogramm	bp	Basenpaare
µl	Mikroliter	BSA	bovines Serumalbumin
µm	Mikrometer	CII	Kollagen Typ II
A	Adenosin	C	Cytidin
AAV	Adeno-assoziiertes Virus	c	Konzentration
ACGT	‚adoptive cellular gene transfer‘	CaCl₂	Calcium-Chlorid
ADAMT	Aggrecanase (‚a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs‘)	CaPO₄	Calcium-Phosphat
AP-1	Aktivator-Protein-1	CCP	citrullinierte Proteine
APC	Antigen-präsentierende Zelle	CD	‚cluster of differentiation‘
APS	Ammoniumperoxydisulfat	cDNA	komplementäre DNA
AS	Aminosäuren	CFA	‚complete Freund’s adjuvans‘
ATP	Adenosintriphosphat	CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
AV	Adenovirus	CMV	Cytomegalovirus
bCII	bovines Kollagen Typ II	ConA	ConcanavalinA
BCA	Bichinolin-4-carbonsäure	COX-2	Cyclooxygenase-2
BCP	1-Brom-3-Chlorpropan	CRP	C-reaktives Protein
BCR	B-Zell Rezeptor	CT	Kontrolle

6. Anhang

CTLA	‚Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen‘	GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
CTR	Kontrolle	gp-39	Knorpel-Glykoprotein-39
d	day	GTC	Guanidin-thiocyanat
DC	dendritische Zellen	h	Stunde
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat	HCL	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N-ethansulfonsäure
d.h.	das heißt	Hind III	Restriktionsendonuklease
DKK-1	Dickkopf Homolog-1	HIV-1	humaner Immundefizienz- Virus Typ1
DLN	‚draining lymph nodes‘	HLA	humanes Leukozytenantigen
DMARD	‚disease modifying antirheumatic drugs‘	HLA-DR	MHC-Zelloberflächenrezeptor
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium	HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl-Transferase
DMSO	Dimethylsulfoxid	HSV	Herpes-Simplex Virus
dn	dominant negativ	IFA	‚incomplete Freud’s Adjuvans‘
dnTAK1	dominant negatives TAK1	IFN	Interferon
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IgG	Immunglobulin G
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	IκB	natürlicher NFκB Inhibitor
DOPE	‚dioleoylphosphatidyl-ethanolamine‘	IKK	IκB Kinase Komplex
Dox	Doxyzyklin	IL	Interleukin
DTT	Dithiothreitol	IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
E.coli	Escherichia coli	IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	iNOS	induzierbare Nitritoxid-Synthese
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	IRAK	‚IL-1R-associated kinase‘
env	‚envelope‘	IRES	‚internal ribosomal entry site‘
ERK	extrazelluläre, signalregulierte Kinase	IV	Intravenös
EtOH	Ethanol	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting	Jun	Transkriptionsfaktor Jun
FasL	Fas-Ligand	kb	kilo Basenpaare
FCS	fetales Kälberserum	KCL	Kaliumchlorid
Fos	Transkriptionsfaktor Fos	kg	Kilogramm
FSC	‚forward scatter‘	konz	konzentriert
g	Erdbeschleunigung	KRAP	Krüppel-assozierte Box
g	Gramm	kV	Kilovolt
G	Guanosin	l	Liter
gag	‚group-specific antigen‘	lat.	Lateinisch
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	lipo	Lipofektamin
GFP	‚green fluorescent protein‘	LMP	Low Melting Point
		LPS	Lipopolysaccharid
		LTR	‚long terminal repeats‘

6. Anhang

Luc	Luziferase	nm	Nanometer
LV	Lentivirus	nmol	Nanomol
MΦ	Makrophagen	NO	Stickstoffmonoxid
M	Mol	NT	„non-transfected“
mA	Milliampère	O.D.	Optische Dichte
MAP3K	MAPK-Kinase Kinase	OPG	Osteoprotegerin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	P	Phospho-
MAPKK	MAPK-Kinase	p38	Protein 38
MAPKKK	MAPK-Kinase Kinase	PAA	Polyacrylamid
MCP-1	„Monocyte chemoattractant protein-1“	PAD	Peptidylarginin-Deiminase
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor	PBS	Phosphate-buffered-saline
MEK	MAPK-Kinase Protein	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
mg	Milligramm	PEG	Polyethylenglycol
MgCl₂	Magnesiumchlorid	Pen	Penicillin
MgSO₄	Magnesiumsulfat	PFA	Paraformaldehyd
MHC	„Major Histocompatibility Complex“	PG	Prostaglandin
min	Minute	pg	Pikogramm
MIP-1	„Macrophage inflammatory protein 1“	PGE₂	Prostaglandin E ₂
MKK	MAPK-Kinase	PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
ml	Milliliter	pmol	Picomol
mm	Millimeter	PnPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
mM	Millimol	pol	Polymerase
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus	PTPN	„protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type“
MMP	Matrixmetalloproteinasen	PVDF	Polyvinylidenfluorid
MOI	„multiplicity of infection“	qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
mRNA	„messenger RNA“	RA	rheumatoide Arthritis
MTX	Methotrexat	RANK	Receptor Activator of NF-κB
MyD88	„Myeloid differentiation primary response gene-88“	RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
NaAc	Natriumacetat	RF	Rheumafaktor
NaCl	Natriumchlorid	RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
NaF	Natriumfluorid	RNA	Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid	RNAi	RNA-Interferenz
Na₄P₂O₇	Tetranatriumpyrophosphat	RNase	Ribonuklease
NEAA	„non-essential amino-acids“	rpm	rounds per minute
NEMO	„NFκB essential modulator“	RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
NFκB	Nuklear-Faktor-κ-B	RT	Raumtemperatur
ng	Nanogramm	rTA	chimärer Transaktivator

6. Anhang

RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion	Vol	Volumen
rTS	Doxyzyklin-abhängiger Silencer	WNT	setzt sich zusammen aus <i>Wg</i> für <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
rtTA	reverser Transaktivator	wt	Wildtyp
S.	Seite	w/v	weight per volume
Sal I	Restriktionsendonuklease	z.B.	zum Beispiel
SDS	Natriumdodecylsulfat	ZnSO₄	Zinksulfat
sec	Sekunde		
s/f	serumfrei		
siCTR	Kontroll-siRNA		
sIL-1RAcP	„soluble IL-1 receptor accessory protein“		
siRNA	„small interfering RNA“		
siTAK1	siRNA gegen TAK1		
SSC	„sidewards scatter“		
Strep	Streptomycin		
T	Thymin		
T	Tag		
TAK1	TGFβ-aktivierte Kinase-1		
TCR	T-Zell Rezeptor		
TE	Tris-EDTA		
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethyldiamin		
TEP	Trypsin-EDTA-PBS		
Tet	Tetrazyklin		
tetO	Tetrazyklin-Operon		
tetR	Tetrazyklin-Repressor		
TGF-β	Transforming growth faktor-β		
Th	T-Helferzellen		
TLR	Toll-like Rezeptor		
TNF	Tumor-Nekrose Faktor		
TNFR	Tumor-Nekrose Faktor Rezeptor		
TRADD	„TNFRSF1A-associated via death domain“		
TRAF	„TNF Receptor Associated Factor“		
TRAIL	„TNF-related apoptosis-inducing ligand“		
T_{Reg}	regulatorische T-Zellen		
U	Unit		
UV	Ultraviolett		
V	Volt		
v/v	volume per volume		

7 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S. and Pittenger, M.F. 2005.** Human mesenchymal stem cells modulate allogenic immune cell responses. *Blood*. 2005, 105, S. 1815-1822.
- Aggarwal, S., et al. 2003.** Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, S. 1910-1914.
- Ahrens, M., et al. 1993.** Expression of human bone morphogenetic protein -2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol.* 1993, 12, S. 871-880.
- Akahoshi, T., et al. 1993.** Expression of monocyte chemoattractant and activating factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1993, 36, S. 762.
- Alonzi, T. et al. 1998.** Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 1998, 187, S. 461-468.
- Alsalameh, S., et al. 2004.** Identification of Mesenchymal Progenitor Cells in Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage. *Arthritis and Rheumatism*. 2004, 50, S. 1522–1532.
- Alvaro-Gracia, J.M., Zvaifler, N.J. and Firestein, G.S. 1990.** Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and CSF production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Clin Invest.* 1990, 86, S. 1790-1798.
- Apparailly, F., et al. 2002.** Tetracycline-inducible Interleukin-10 gene transfer mediated by an adeno-associated virus: Application to experimental arthritis. *Hum Gene Ther.* 2002, 13, S. 1179-1188.
- Arnheim, K., Becker-Follmann, J. et al. 1994.** Inflammation. *Herder Lexikon der Biologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford : Spektrum Akademischer Verlag, 1994, Bd. 3, S. 143-144.
- Athanasou, N.A. 1995.** Synovial macrophages. *Ann. Rheum. Dis.* 1995, 54, S. 392-394.
- Baslund, B. et al. 2005.** Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof of concept study. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, S. 2686-2692.
- Bedard, P.A. and Golds, E.E. 1993.** Cytokine induced expression of mRNAs for chemotactic factors in human synovial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1993, 154, S. 433.
- Benito, M.J., et al. 2004.** Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, S. 1781-1787.
- Bernhard, J. and Villiger, P.M. 2001.** Rheumatoide Arthritis: Pathogenese und Pathologie. *Schweiz Med Forum.* 2001, 8, S. 179-183.
- Bertolini, D.R., et al. 1986.** Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature*. 1986, 319, S. 516-518.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. 2006.** Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006, 441, S. 235-238.
- Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. 2008.** Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine*. 2008, 4, S. 373-375.

- Boissier MC, Chiochia G, Bessis N, et al. 1995.** Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 1995, 25, S. 1184-1890.
- Boissier, M.C., et al. 1987.** Experimental autoimmune arthritis in mice.I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 1987, 46, S. 691-700.
- Brackertz, D., Mitchell, G.F. and Mackay, I.R. 1977.** Antigen-induced arthritis in mice.I.Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum.* 1977, 20, S. 841-850.
- Brand, D.D., Latham, K.A. and Rosloniec, E.F. 2007.** Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols.* 2007, Bd. 2, 5, S. 1269-1275.
- Brennan, F.M. et al. 2002.** Evidence that rheumatoid arthritis synovial T-cells are similar to cytokine-activated T-cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor κ B pathways in tumor necrosis factor α production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, S. 31-41.
- Bresnihan, B. 2001.** The safety and efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2001, 30, S. 17-20.
- Bridge, A.J., et al. 2003.** Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Gent.* 2003, 34, S. 263-4.
- Brunsberg, U., et al. 1994.** Expression of transgenic class II Ab gene confers susceptibility to collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 1994, 24, S. 1698-1702.
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S. and Dempsey, M.P. 1993.** A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature.* 1993, 365, S. 666-669.
- Burke, B., et al. 2002.** Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets. *Journal of Leukocyte Biology.* 2002, 72, S. 417-428.
- Butler, D.M. et al. 1997.** DBA/1 mice expressing human TNF-alpha transgene develop a severe erosive arthritis: characterisation of the cytokine cascade and cellular composition. *J. Immunol.* 1997, 159, S. 2867-2876.
- Campbell, I.K., et al. 2000.** Distinct roles for NF-kappa B1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 2000, 105, S. 1799-1806.
- Cashman, S.M., et al. 2006.** Inhibition of choroidal neovascularization by adenovirus-mediated delivery of short-hairpin RNAs targeting VEGF as a potential therapy for AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006, 47, S. 3496-3504.
- Catterall, J.B. et al. 2001.** Synergistic induction of matrix metalloproteinase 1 by interleukin-1 α and oncostatin M in human chondrocytes involves signal transducer and activator of transcription and activator protein 1 transcription factors via a novel mechanism. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, S. 2296-2310.
- Chabaud, M., et al. 1999.** A T cell derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis and Rheumatism.* 1999, 42, S. 963-970.
- Chabaud-Riou, M. and Firestein, G.S. 2004.** Expression and activation of MKK3 and MKK6 in rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, S. 177-184.
- Chang, J.S., et al. 1992.** Bone resorption by cells isolated from rheumatoid synovium. *Ann. Rheum. Dis.* 1992, 51, S. 1223-1229.
- Chen, X., et al. 2006.** A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2006, 66, S. 11323-11330.

- Chernajovsky, Y., Gould, D.J. and Podhajcer, O.L. 2004.** Gene therapy for autoimmune diseases: quo vadis? *Nat Rev Immunol.* 2004, 4, S. 800-811.
- Choi, J.J., et al. 2008.** Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immunol.* 2008, 153, S. 269-76.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162, S. 156-159.
- Choy, E.H., et al. 2002.** Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, S. 3143-3150.
- Coffin, J.M. 1996.** *Fields Virology.* Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1996. S. 1767-1847. Bd. 3.
- Connolly, J.B. 2002.** Lentiviruses in gene therapy clinical research. *Gene Therapy.* 2002, 9, S. 1730-1734.
- Courtenay, J.S., et al. 1980.** Immunization against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature.* 1980, 283, S. 666-668.
- Coussens, L.M. and Werb, Z. 2002.** Inflammation and Cancer. *Nature.* 420, 2002, S. 860-867.
- Crombez, L., et al. 2007.** A non-covalent peptide-based strategy for siRNA delivery. *Biochem Soc Trans.* 2007, 35, S. 44-46.
- Crombrez, L., et al. 2007.** A non-covalent peptide-based strategy for siRNA delivery. *Biochem Soc Trans.* 2007, 35, S. 44-46.
- Cronstein, B.N. 2007.** Interleukin-6: A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* 2007, 65, S. 11-15.
- Cua, D.J. et al. 2003.** Interleukin-23 rather than interleukin-12 is critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003, 421, S. 744-748.
- Dayer, J.M. and Bresnihan, B. 2002.** Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, S. 574-578.
- Dayer, J.M. and Burger, D. 2004.** Cell-cell interactions and tissue damage in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2004, 3, S. 14-16.
- De Bari, C., et al. 2006.** Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, S. 1209-21.
- De Bari, C., et al. 2001.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 44, 2001, S. 1928-42.
- de Fougères, A., et al. 2007.** Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2007, 6, S. 443-453.
- Diarra, D. et al. 2007.** Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature Med.* 2007, 13, S. 156-163.
- Diebold, S.S., et al. 2004.** Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* 2004, 303, S. 1529-31.
- Djouad, F., et al. 2005.** Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, S. 1595-603.
- Doncarli, A., et al. 1997.** Conversion in vivo from an early dominant Th0/Th1 response to a Th2 phenotype during development of collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 1997, 25, S. 1451-1458.

- Dudler, J., et al. 2000.** Effect of interleukin 17 on proteoglycan degradation in murine joint knees. *Ann. Rheum. Dis.* 2000, 59, S. 529-532.
- E Silva, M.R. 1994.** A brief survey of the history of inflammation. *Agents Actions.* 43, 1994, S. 86-90.
- Eberhardt, W., et al. 2000.** Amplification of IL-1 β induced matrix-metelloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells in mediated by increased activities of NF κ B and AP-1 and involves activation of MAPK pathways. *J. Immunol.* 2000, 165, S. 5788-5797.
- Ehrenstein, M.R. et al. 2004.** Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J. Exp. Med.* 2004, 200, S. 277-285.
- Ehrenstein, M.R. et al. 2004.** Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J. Exp. Med.* 2004, 200, S. 277-285.
- Elbashir, S.M., et al. 2001.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001, 411, S. 494-498.
- Emery, P., et al. 2006.** The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, S. 1390-400.
- Feldmann, M., Brennan, F.M. and Maini, R.N. 1996.** Rheumatoid arthritis. *Cell.* 1996, 85, S. 307-310.
- Feldmann, M.; Brennan, F.M.; Maini, R.N. 1996.** Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 1996, 14, S. 397-440.
- Fijen, J., et al. 2001.** Supression of the clinical and cytokine response to endotoxin by RWJ-67657, a p38 mitogen-activated proteinkinase inhibitor, in healthy human volunteer. *Clin. Exp. Immunol.* 2001, 124, S. 16-20.
- Filieur, S., et al. 2003.** siRNA mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer Res.* 2003, 63, S. 3919-3922.
- Finnegan, A., et al. 1999.** Proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis in BALB/c mice is a Th1-type disease regulated by Th2 cytokines. *J. Immunol.* 1999, 163, S. 5383-5390.
- Fire, A., et al. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998, 391, S. 806-811.
- Firestein, G.S. 2003.** Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003, 423, S. 356-361.
- Firestein, G.S. 2004.** NF κ B: Holy grail for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2004, 50, S. 2281-2386.
- Firestein, G.S. and Zvaifler, N.J. 1990.** How important are T-cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis and Rheumatism.* 1990, 33, S. 768-773.
- Fleischmann, R., et al. 2002.** Safety and efficacy of disease-modifying anti-rheumatic agents: focus on the benefits and risks of etanercept. *Drug Saf.* 2002, 25, S. 173-97.
- Fournier, C. 2005.** Where do T-cells stand in Rheumatoid Arthritis? *Joint Bone Spine.* 2005, 72, S. 527-532.
- Franklin, E.C., et al. 1957.** An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 1957, 105, S. 425-435.
- Frisch, B., et al. 2004.** A new triantennary galactose-targeted PEGylated gene carrier, characterization of its complex with DNA, and transfection of hepatoma cells. *Bioconjug Chem.* 2004, 15, S. 754-764.

- Gabay, C. and Arend, W.P. 1998.** Treatment of rheumatoid arthritis with IL-1 inhibitors. *Springer Seminars in Immunopathology*. 1998, 20, S. 229-246.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. 1998.** NF κ B and Rel Proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998, 16, S. 225-260.
- Glennie, S., et al. 2005.** Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T-cells. *Blood*. 2005, 105, S. 2821-7.
- Gossen, M. and Bujard, H. 1992.** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci*. 1992, 15, S. 5547-51.
- Gouze, E., et al. 2002.** In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol Ther*. 2002, 5, S. 397-404.
- Gouze, E., et al. 2003.** Lentiviral-mediated gene delivery to synovium: Potent intra-articular expression with amplification by inflammation. *Mol Ther*. 2003, 7, S. 460-466.
- Gracie, J.A., et al. 1999.** A proinflammatory role of IL-18 in rheumatoid arthritis. *Journal of clinical investigations*. 1999, 104, S. 1393-1401.
- Gravallese, E.M. et al. 2000.** Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*. 2000, 43, S. 250-258.
- Gubler, U. and Hoffmann, B.J. 1983.** A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*. 1983, Bd. 25, S. 263-269.
- Hammaker, D.R., et al. 2007.** Regulation of the JNK pathway by TGF-beta activated kinase 1 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2007, 9.
- Han, Z., et al. 1998.** AP-1 and NF κ B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity*. 1998, 28, S. 197-208.
- Han, Z., et al. 2001.** c-Jun terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest*. 2001, 108, S. 73-81.
- Han, Z., et al. 2002.** Joint damage and inflammation in c-Jun N-terminal kinase 2 knockout mice with passive murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002, 46, S. 818-823.
- Han, Z., et al. 1999.** Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol. Exp. The*. 1999, 291, S. 124-130.
- Handel, M.L., McMorro, L.B. and Gravallese, E.M. 1995.** Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium: localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum*. 1995, 38, S. 1762-1770.
- Harris, E.D. 1990.** Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*. 1990, 332, S. 1277-1289.
- Heil, F., et al. 2004.** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004, 303, S. 1526-9.
- Hempel, L., et al. 1995.** Interleukin-10 directly inhibits the interleukin-6 production in T-cells. *Scand J Immunol*. 1995, 41, S. 462-6.
- Hofbauer, L.C., et al. 2000.** The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res*. 2000, 15, S. 2-12.

- Hoffmann, A., et al. 2005.** Transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1), a MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine mesenchymal progenitors. *J Biol Chem.* 2005, 280, S. 27271-83.
- Holmdahl, R., et al. 1985.** Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 1985, 29, S. 106-113.
- Hopkins, S.J., Freemont, A.J. and Jayson, M.I. 1984.** Pristane-induced arthritis in Balb/c mice.I. Clinical and histological features of arthropathy. *Rheumatol.Int.* 1984, 5, S. 21-28.
- Horwood, N.J., et al. 1998.** Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblast stromal cells. *Endocrinology.* 1998, 139, S. 4743-4746.
- Hosaka, S., et al. 1994.** Expression of the chemokine superfamily in rheumatoids arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1994, 97, S. 451.
- Howard, K.A., et al. 2006.** RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther.* 2006, 14, S. 476-484.
- Howard, K.A., et al. 2006.** RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nonparticle system. *Mol Ther.* 2006, 14, S. 476-484.
- Huang, H., et al. 2006.** Osteoclast differentiation requires TAK1 and MKK6 for NFATc1 induction and NF-kappaB transactivation by RANKL. *Cell Death Differ.* 2006, 13, S. 1879-91.
- Jaques, C., et al. 2006.** The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and catilage degradation. *Vitam Horm.* 2006, 74, S. 371-403.
- Jenkins, J.K., Hardy, K.J. and McMurray, R.W. 2002.** The Pathogenesis of rheumatoid arthritis: A guide to therapy. *Am J Med Sci.* 2002, 323 (4), S. 171-180.
- Johnson, G.L. and Lapadat, R. 2002.** Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science.* 2002, 298, S. 1911-1912.
- Joyce, D.A., et al. 1994.** Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, IL-10 and IL-4, have contrasting effects on release of soluble p75 TNF receptor by cultured monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1994, 24, S. 2699-705.
- Kato, K., et al. 2005.** Human immunodeficiency virus vector-mediated intra-articular expression of angiostatin inhibits progression of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatol Int.* 2005, 25, S. 522-529.
- Keffer, J. et al. 1991.** Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 1991, 10, S. 4025-4031.
- Keystone, E.C. 2003.** Abandoned therapies and unpublished trials in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2003, 15, S. 253-258.
- Khoury, M., et al. 2006.** Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor α in experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, S. 1867-1877.
- Khoury, M., Jorgensen, C. and Apparailly, F. 2007.** RNAi in arthritis: Prospects of a future therapy in inflammation. *Curr Opin Mol Ther.* 2007, 9, S. 483-489.
- Kim SH, et al.,. 2002.** Ex vivo gene delivery of IL-1Ra and soluble TNF receptor confers a distal synergistic therapeutic effect in antigen-induced arthritis. *J Immunol.* 2002, 6, S. 591-600.
- Kim, J.Y., et al. 2008.** TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J Bio Chem.* 2008, 283, S. 137-44.

- Kim, M., et al. 2006.** Inhibition of hepatitis C virus gene expression by small interfering RNAs using a tri-cistronic fulllength viral replicon and a transient mouse model. *Virus Res.* 2006, 122, S. 1-10.
- Klareskog, L., Padyukov, L. and Alfredsson, L. 2007.** Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2007, 19, S. 49-54.
- Klatt, A.R., et al. 2006.** TAK1 downregulation reduces IL-1beta induced expression of MMP13, MMP1 and TNF-alpha. *Biomed Pharmacother.* 2006, 60, S. 55-61.
- Koch, A.E., et al. 1992.** Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1992, 90, S. 772.
- Koch, A.E., et al. 1992.** Interleukin-8 as a macrophage derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992, 258, S. 1798.
- Koch, A.E., et al. 1991.** Synovial tissue macrophages as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *Journal of Immunology.* 1991, 147, S. 2187.
- Koga, T. et al. 1985.** Auto joint inflammation in mice after systemic injection of the cell wall, its peptidoglycan, and chemically defined peptidoglycan subunits from various bacteria. *Infect. Immun.* 1985, 50, S. 27-34.
- Kong, Y.Y., et al. 1999.** Nature. *Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand.* 1999, 402, S. 304-309.
- Kotake, S. et al. 1999.** IL-17 in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 1999, 103, S. 1345-1352.
- Kouskoff, V. et al. 1996.** Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell.* 1996, 87, S. 811-822.
- Kracht, M. and Saklatvala, J. 2002.** Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine.* 20, 2002, S. 91-106.
- Kremer, J.M., et al. 2006.** Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2006, 144, S. 865-76.
- Kumar, S., Boehm, J. and Lee, J.C. 2003.** p38 MAP Kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature Review Drug Discovery.* 2003, 2, S. 717-726.
- Lam, J. et al. 2000.** TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J. Clin. Invest.* 2000, 106, S. 1481-1488.
- Lämmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227, S. 680-685.
- Lang, B. 1991.** Immunogenetik. [Hrsg.] H.H. Peter. *Klinische Immunologie.* München : Urban&Schwarzenberg, 1991, 3, S. 39-46.
- Lewis, P.F. and Emerman, M. 1994.** Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 1994, 68, S. 510-516.
- Li, P. et al. 2004.** RANK signaling is not required for TNF α -mediated increase in CD11b^{hi} osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNF α -mediated inflammatory arthritis. *J. Bone Miner. Res.* 2004, 19, S. 207-213.
- Liu, H.H., et al. 2006.** Essential role of TAK1 in thymocyte development and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103, S. 11677-82.

- Loetscher, P., et al. 1998.** CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998, 391, S. 344-345.
- Lubberts, E. et al. 2002.** Overexpression of IL-17 in the knee joint of collagen type II immunized mice promotes collagen arthritis and aggravates joint destruction. *Inflamm. Res.* 2002, 51, S. 102-104.
- Lubberts, E., Koenders, M.I. and Van den Berg, W.B. 2005.** The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther.* 2005, 7, S. 29-37.
- Luciw, P.A. 1996 .** Human immunodeficiency viruses and their replication . [Buchverf.] Fields B.N., D.M. Knipe and P.M. Howöey. *Fundamental Virology*. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1996 .
- Luqmani, R., et al. 2006.** British Society for Rheumatology and British Health Professionals in Rheumatology Guideline for the Management of Rheumatoid Arthritis (the first two years). *Rheumatology*. 2006, 45, S. 1167-1169.
- Maini, R.N. and Taylor, P.C. 2000.** Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Med.* 2000, 51, S. 207-229.
- Maini, R.N., Paulus, H. Breedveld, F.C. et al. 1997.** rHuIL-10 in subjects with active rheumatoid arthritis (RA): a phase I and cytokine response study. *Arthritis Rheum.* 1997, 40, S. 224.
- Makarov, S.S., et al. 1997.** NF-kappa B as a target for anti-inflammatory gene therapy: suppression of inflammatory responses in monocytic and stromal cells by stable gene transfer of I kappa B alpha cDNA. *Gene Ther.* 1997, 4, S. 846-52.
- Mangan, P.R., et al. 2006.** Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. *Nature*. 2006, 441, S. 231-234.
- Manoury-Schwartz B, Chiochia G, Bessis N, et al. 1997.** High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol.* 1997, 158, S. 5501-5506.
- Marok, R., et al. 1996.** Activation of of the transcription factor nuclear factor-kappa B in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 1996, 39, S. 583-591.
- Maruotti, N., et al. 2007.** Macrophages in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol.* 2007, 22, S. 581-586.
- McInnes, I.B. and Liew, F.Y. 2005.** Cytokine networks-towards new therapies for rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2005, 1, S. 31-39.
- McInnes, I.B. and Schett, G. 2007.** Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*. 2007, 7, S. 429-442.
- McInnes, I.B., Liew, F.Y. and Gracie, J.A. 2005.** Interleukin-18: a therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Arthritis Rex. Ther.* 2005, 7, S. 38-41.
- Miagkov, A.V., et al. 1998.** NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci.* 1998, 10, S. 13859-64.
- Miller, A.D. 1997.** Development and applications of retroviral vectors. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- Mizukami, J., et al. 2002.** Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol.* 2002, 22, S. 992-1000.
- Mohammed, F.F., Smookler, D.S. and Khokha, R. 2003.** Metalloproteinases, inflammation and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003, 62, S. ii43-ii47.

- Moitz, F., et al. 2006.** Technology insight: gene transfer and the design of novel treatments for rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2006, 2, S. 153-162.
- Mor, A., Abramson, S.B. and Pillinger, M.H. 2005.** The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*. 2005, 115, S. 118-128.
- Moreland, L.W., et al. 1997.** Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *The new England Journal of Medicine*. 1997, 337, S. 141-147.
- Mori, L., et al. 1996.** Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *Journal of Immunology*. 1996, 157, S. 3178-3182.
- Morrissey, D.V., et al. 2005.** Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*. 2005, 23, S. 1002-7.
- Mosmann, T.R., et al. 1986.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986, 136, S. 2348-2357.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987, 155, S. 335-350.
- Murakami, S., Lefebvre, V. and de Crombrughe, B. 2000.** Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor α . *J Biol Chem*. 275, 2000, S. 3687-92.
- Murphy, C.A. et al. 2003.** Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med*. 2003, 198, S. 1951-1957.
- Nakagami, H., et al. 2006.** Anti-Oxidant Gene Therapy by NF κ B Decoy Oligodeoxynucleotide. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2006, 7, S. 95-100.
- Nathan, C. 2002.** Points of control in inflammation. *Nature*. 2002, 420, S. 846-852.
- Ninomiya-Tsuji, J., et al. 1999.** The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*. 1999, 398, S. 252-256.
- Nishikawa, M., et al. 2003.** Prevention of the onset and progression of collagen-induced arthritis in rats by the potent p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor FR167653. *Arthritis Rheum*. 2003, 43, S. 2670-2681.
- Nishimoto, N. and Kishimoto, T. 2006.** Interleukin 6: from bench to bedside. *Nature Clin. Prac. Rheumatol*. 2006, 2, S. 619-626.
- Nishimoto, N., et al. 2004.** Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2004, 50, S. 1761-1769.
- Olsen, N.J. and Stein, C.M. 2004.** New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004, 350, S. 2167-79.
- Omori, E., et al. 2006.** TAK1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2006, 281, S. 19610-7.
- Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. 2008.** The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. 2008, 28, S. 454-67.
- Palu, G., et al. 2000.** Progress with retroviral gene vectors. *Rev. Med. Virol*. 2000, 10, S. 185-202.
- Panayi, G. S. 2006.** Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism? *Nature Clin. Pract. Rheumatol*. 2006, 2, S. 58-59.
- Pargellis, C. and Regan, J. 2003.** Inhibitors of p38 mitogen activated protein kinase for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Invest. Drugs*. 2003, 4, S. 566-571.

- Parker, A.L., et al. 2003.** Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2003, 5, S. 1-21.
- Pasparakis, M., Schmidt-Supprian, M. and Rajewsky, K. 2002.** IkappaB kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells. *J Exp Med.* 2002, 16, S. 743-52.
- Popescu, F.D. 2005.** Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy. *J Cell Mol Med.* 2005, 9, S. 840-853.
- Ranges, G.E., Sriram, S. and Cooper, S.M. 1985.** Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. *J Exp Med.* 1985, 162, S. 1105-10.
- Rao, K.M.K. 2001.** MAP kinase activation in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology.* 2001, 69, S. 3-10.
- Raschke, WC et al. 1978.** Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 1978, 15, S. 261-267.
- Rasmusson, I., et al. 2005.** Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res.* 2005, 305, S. 33-41.
- Rathanaswami, P., et al. 1993.** Synergistic effect of Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts. Evidence that Interleukin-8 is the major neutrophil-activating chemokine released in response to monokine activation. *Arthritis Rheum.* 1993, 36, S. 1295.
- Rosloniec, E.F., et al. 1996.** Collagen-Induced Arthritis. *Current Protocols in Immunology.* 15.5.1-15.5.24, 1996.
- Sabino, K.C., et al. 1999.** Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcohol extract of seeds of *Pterodon pubescens*. *Phytother Res.* 1999, 13, S. 613-5.
- Saito, S., et al. 2001.** Important role of membrane-associated CD14 in the induction of IFN- β and subsequent nitric oxide production by murine macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide. *European Journal of Biochemistry.* 2001, 267, S. 37 - 45.
- Sasai, M., et al. 1999.** Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6 deficient mice. *Arthritis Rheum.* 1999, 42, S. 1635-1643.
- Sato, K. et al. 2006.** Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.* 2006, 203, S. 2673-2682.
- Sato, S., et al. 2005.** Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005, 6, S. 1087-95.
- Sato, S., et al. 2006.** TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells. *Int Immunol.* 2006, 18, S. 1405-11.
- Scheinecker, C., Redlich, K. and Smolen, J.S. 2008.** Cytokines as Therapeutic Targets: Advances and Limitations. *Immunity.* 2008, 28, S. 440-444.
- Schett, G. 2007.** Joint remodelling in inflammatory disease. *Ann Rheum Dis.* 2007, 66, S. 42-44.
- Schett, G., et al. 2000.** Activation, differential localization, and regulation of stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinases, and p38 mitogen-activated kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2000, 43, S. 2501-2512.
- Schindler, J.F., Monahan, J.B. and Smith, W.G. 2007.** p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *J Dent Res.* 2007, 86, S. 800-811.

- Schultze-Koops, H. and Kalden, J.R. 2001.** The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001, 15, S. 677-691.
- Schweizer, M., et al. 2001.** Retroviral Vectors. [Hrsg.] Springer Verlag. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz.* 2001, 44, S. 1038-1046.
- Seitz, M., et al. 1994.** Constitutive mRNA and protein production of macrophage colony-stimulating factor but not of other cytokines by synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *J. Rheumatol.* 1994, 33, S. 613-619.
- Sha, W.C., et al. 1995.** Targeted disruption of the p50 subunit of NF κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell.* 1995, 80, S. 321-30.
- Shen, J., et al. 2006.** Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther.* 2006, 13, S. 225-234.
- Shibuya, H., et al. 1998.** Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development. *EMBO J.* 1998, 17, S. 1019-1028.
- Shim, J.H., et al. 2005.** TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* 2005, 19, S. 2668-81.
- Shinohara, H., et al. 2005.** PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *J Exp Med.* 2005, 202, S. 1423-31.
- Shouda, T., et al. 2001.** Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 2001, 108, S. 1781-1788.
- Siddiqui, M.A.A. 2007.** The efficacy and tolerability of newer biologics in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2007, 19, S. 308-313.
- Sigidin, Y.A. et al. 2001.** Randomized, double-blind trial of anti-interferon-gamma antibodies in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2001, 30, S. 203-207.
- Simmonds, R.E. and Foxwell, B.M. 2008.** NF- κ B and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology.* 2008, 47, S. 584-590.
- Simonet, W.S. et al. 1997.** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997, 89, S. 309-319.
- Sioud M, Soerensen DR. 2003.** Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 312, S. 1220-1225.
- Sioud, M. 2005.** Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol.* 2005, 348, S. 1079-90.
- Sioud, M. and Soerensen, D.R. 2003.** Cationic-liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 312, S. 1220-1225.
- Skapenko, A., et al. 2005.** The role of T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2005, 7, S. 4-14.
- Smith, P.K. et al. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985, 150, S. 75-85.
- Smolen, J.S. and Steiner, G. 2003.** Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2003, 2, S. 473-488.
- Smolen, J.S., et al. 2008.** Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet.* 2008, 371, S. 987-97.

- Sorensen, D.R., Leirdal, M. and Sioud, M. 2003.** Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol.* 2003, 327, S. 761-6.
- Srivastava, A.K., et al. 2007.** Tumor necrosis factor- α augments matrix metalloproteinase-9 production in skeletal muscle cells through the activation of transforming growth factor- β -activated kinase 1 (TAK1)-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 2007, 282, S. 35113-24.
- Steffen, C. 1970.** Consideration of pathogenesis of rheumatoid arthritis as collagen autoimmunity. *Z Immunitätsforsch Allerg Klin Immunol.* 1970, 139, S. 219-27.
- Steinmann, L. 2007.** A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007, 13, S. 139-45.
- Suda, T., et al. 1999.** Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999, 20, S. 345-57.
- Sun, L., et al. 2004.** The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell.* 2004, 14, S. 289-301.
- Sundarrajan, M., et al. 2003.** Expression of the MAPK kinases MKK-4 and MKK-7 in rheumatoid arthritis and their role as key regulators of JNK. *Arthritis Rheum.* 2003, 48, S. 2450-2460.
- Sweeney, S.E. and Firestein, G.S. 2004.** Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2004, 36, S. 372-378.
- . 2004. Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004, 16, S. 231-237.
- Szekanecz, Z. and Koch, A.E. 2007.** Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2007, 19, S. 289-295.
- Szekanecz, Z., et al. 1998.** Chemokines in RA. *Springer Semin Immunopathol.* 1998, 20, S. 115-132.
- Tak, P.P., et al. 2001.** Inhibitor of nuclear factor κ B kinase β is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, S. 1897-907.
- Tak, P.P., et al. 2000.** Rheumatoid arthritis and p53: How oxidative stress might alter the course of inflammatory disease. *Immunology Today.* 2000, 21, S. 78-82.
- Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. 2003.** TAK1 is critical for I κ B kinase-mediated activation of NF- κ B pathway. *J Mol Biol.* 2003, 326, S. 105-115.
- Takayanagi, H. et al. 2000.** T-cell mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN γ . *Nature.* 2000, 203, S. 600-605.
- Tanaka, M., et al. 1999.** Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK- β -deficient mice. *Immunity.* 1999, 10, S. 421-9.
- Taub, D.D. 1996.** C-C chemokines - an overview. [Buchverf.] A.E. Koch and R.M. Strieter. *Chemokines in disease.* Austin : RG Landes Company, 1996, S. 27-54.
- Teitelbaum, S.L. 2000.** Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000, 289, S. 97-100.
- Thompson, B., et al. 2005.** Neutral postgrafted colloidal particles for gene delivery. *Bioconj Chem.* 2005, 16, S. 608-614.
- Toh, M.L. and Miossec, P. 2007.** The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2007, 19, S. 284-288.

- Tomita, T., et al. 1999.** Suppressed severity of collagen-induced arthritis by in vivo transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum.* 1999, 42, S. 2532-42.
- Toniatti, C., et al. 2004.** Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther.* 2004, 11, S. 649-657.
- Tracey, K.J. 2002.** The inflammatory reflex. *Nature.* 2002, 420, S. 860-867.
- Traister, R.S. and Hirsch, R. 2008.** Gene therapy for arthritis. *Mod Rheumatol.* 2008, 18, S. 2-14.
- Turesson, C. and Matteson, E.L. 2007.** Extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 2007, 5, S. 72-77.
- Udagawa, N. et al. 1997.** Interleukin-18 (interferon γ inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- γ to inhibit osteoclast formation. *J. Exp. Med.* 1997, 185, S. 1005-1012.
- Van de Loo, F.A.J., Smeets, R.L. and Van den Berg, W.B. 2004.** Gene therapy in animal models of rheumatoid arthritis: are we ready for the patients? *Arthritis Res. Ther.* 2004, 6, S. 183-196.
- Van den Berg, W.B. 2002.** Lessons from animal models of arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2002, 4, S. 232-239.
- van der Helm-van Mil, A. H., Wesoly, J. Z. and Huizinga, T. W. 2005.** Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2005, 17, S. 299-304.
- Vannier, E., Miller, L.C. and Dinarello, C.A. 1992.** Coordinated antiinflammatory effects of interleukin-4: interleukin-4 suppresses interleukin 1 production but upregulates gene expression and synthesis of interleukin-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, 89, S. 4076-4080.
- Verheijden GF, Rijnders AW, Bos E, Coenen-de Roo CJ, van Staveren CJ, Miltenburg AM, Meijerink JH, Elewaut D, de Keyser F, Veys E, Boots AM. 1997.** Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997, 6, S. 1115-25.
- Veys, E.M. et al. 1997.** A randomized, double-blind study comparing 24 week treatment with recombinant IFN γ versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997, 40, S. 62-68.
- Vigna, E. and Naldini, L. 2000.** Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gen. Med.* 2000, 2, S. 308-316.
- Vincenti, M.P. and Brinckerhoff, C.E. 2002.** Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002, 4, S. 157-164.
- Vita, S.D. et al. 2002.** Efficacy of selective B-cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: Evidence for a pathogenic role of B-cells. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, S. 2029-2033.
- Voll, R.E. and Kalden, J.R. 2005.** Do we need new treatment that goes beyond tumor necrosis factor blockers for rheumatoid arthritis? *Ann. NY Acad. Sci.* 2005, 1051, S. 799-810.
- Wahle, M. and Baerwald, C.G.O. 1999.** Zellvermittelte Immunreaktionen am Beispiel der rheumatoiden Arthritis. *Der Internist.* 1999, 40, S. 930-935.
- Wald, D., et al. 2001.** IRAK and TAK1 are required for IL-18 mediated signalling. *Eur J Immunol.* 2001, 31, S. 3747-3754.
- Walmsley, M., et al. 1996.** Interleukin-10 inhibition of the pregression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 1996, 39, S. 495-503.

- Walz, A., Kunkel, S.L. and Strieter, R.M. 1996.** C-X-C chemokines - an overview. [Buchverf.] A.E. Koch and R.M. Strieter. *Chemokines in disease*. Austin : RG Landes Company, 1996, S. 1-25.
- Wan, Y.Y., et al. 2006.** The kinase TAK1 integrates antigen and cytokine receptor signaling for T cell development, survival and function. *Nature Immunol.* 2006, 6, S. 851-8.
- Wang, E.A., et al. 1993.** Bone morphogenetic protein causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth factors*. 9, 1993, S. 57-71.
- Wang, Y.L., et al. 2005.** Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci Res.* 2005, 53, S. 241-249.
- Waßmuth, R. 1994.** Immungenetik der chronischen Polyarthritis. *Akt Rheumatol.* 1994, 19, S. 72-76.
- Weiss, U. 2002.** Inflammation. *Nature.* 2002, 420, S. 845.
- Wendling, J.M., Racadot, E. and Wijdenes, J. 1993.** Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin-6 monoclonal antibody. *Journal of Rheumatology.* 1993, 20, S. 259-262.
- Wikipedia.** Wikipedia, Entzündung. [Online] Wikimedia Foundation Inc.,. [Zitat vom: 24. 7 2008.] <http://de.wikipedia.org/wiki/Entz%C3%BCndung>.
- Wu, Y., et al. 2005.** Specific anti-viral effects of RNA interference on replication and expression of hepatitis B virus in mice. *Chin Med J (Engl).* 2005, 118, S. 1351-1356.
- Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL., 2000.** Interleukin (IL)-22, a Novel Human Cytokine That Signals through the Interferon Receptor-related Proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem.* 2000, 275, S. 31335-31339.
- Xu, G. et al. 2005.** Role of Osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, S. 1060-1067.
- Xu, J., et al. 2007.** Effects of small interferece RNA against PTP1B and TCPTP on insulin signaling pathway in mouse liver: Evidence for non-synergistic cooperation. *Cell Biol Int.* 2007, 31, S. 88-91.
- Xu, J., et al. 2005.** Reduction of PTP1B by RNAi upregulates the activity of insulin controlled fatty acid synthase promotor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 329, S. 538-543.
- Yamaguchi, K., et al. 1995.** Identification of a member of MAPKKK family as a poetntial mediator of TGF β signaltransduction. *Science.* 1995, 270, S. 2008-2011.
- Yoshida, H. et al. 1990.** The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990, 345, S. 442-444.
- Yumoto, K. et al. 2002.** Osteopontin deficiency protects joints against destruction in anti-type II collagen induced arthritis in mice. *Proc. Natl. Acad.* 2002, 99, S. 4556-4561.
- Ziolkowska, M., et al. 2000.** High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *Journal of immunology.* 2000, 164, S. 2832-2838.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. Gerhard Gross für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, seine stetige Hilfsbereitschaft, konstruktive Kritik und sein humorvolles, freundliches Wesen.

Besonderer Dank gebührt Frau PD Dr. Andrea Hoffmann für die gute Betreuung und Unterstützung über die ganze Zeit der Doktorarbeit. Sie war mir immer eine große Hilfe im Theoretischen wie Praktischen und stand mir stets mit guten Ratschlägen, scheinbar unerschöpflichem, fachlichen Wissen und aufmunternden Worten zur Seite! Vielen Dank dafür!

Vielen Dank an Prof. Dr. Jürgen Wehland für die Übernahme des Koreferats und die damit verbundenen Mühen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Mendel für die Teilnahme am Prüfungskomitee und die damit verbundenen Mühen.

Ich danke auch unseren Kooperationspartnern in Frankreich/ Montpellier von der Arbeitsgruppe von Dr. Jorgensen, insbesondere Gabriel und Florence, für die tatkräftige Unterstützung der Projekte, die dreimonatige Aufnahme zum Erlernen des CIA-Modells und die Bereitstellung der Lipoplex-Technik.

Dank auch an meine wundervollen Kollegen im Labor! Sandra III, Inge, Stephie, Doris, Henning – ihr seid einfach toll und ich bin froh mit Euch zusammenzuarbeiten. Danke für die vielen aufmunternden Worte und den Spaß den wir zusammen im Laboralltag haben. Dank gilt auch den „Ehemaligen“ des Labors, insbesondere Sandra I, Caro, Berit und Andreas, die durch unsere gemeinsame Zeit im Labor nicht nur Kollegen, sondern gute Freunde geworden sind! Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter aus dem 3. Stock des D-Gebäudes für ein ungezwungenes, gutes Arbeitsklima und die großartige Hilfsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei meinen besten Freunden bedanken: Tini, Marcus&Patrick und Alex, es ist schön dass ich euch habe und ihr zu jeder Tages- und Nachtzeit für mich da seid. Danke auch an Roberto, der die Fähigkeit besitzt mich immer wieder zu motivieren, anzutreiben und auch zu angemessenen Zeitpunkten auf den Boden der Tatsachen zurückzuholen. Das QiGong und TaiJi haben mir die nötige Ruhe und Ausgeglichenheit gegeben um diese Arbeit fertig zu stellen! Vielen Dank dafür an unsere TaiJi Truppe!

Danke auch an meinen Bruder Patrick, dass er immer für mich da ist und mich in zahlreichen Gesprächen immer wieder aufzumuntern wusste und mir dadurch viel Kraft und Unterstützung gab!

Zu guter letzt, aber in meinem Herzen an erster Stelle, möchte ich meinen Eltern Helmut und Perry danken. Ihr seid einfach wunderbar und die besten Eltern die man sich nur wünschen kann. Eure stetige und bedingungslose Liebe und Unterstützung haben mir Kraft, Mut und Halt in allen Lebenslagen geboten. Ihr seid mein Fels in der Brandung und habt mir das alles erst ermöglicht. Ich liebe Euch von ganzem Herzen!

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

<i>Name</i>	Virginia Seiffart
<i>Karrierestatus</i>	Diplom-Biologin
<i>Geburtsdatum</i>	26. Februar 1981
<i>Geburtsort</i>	Bad Harzburg
<i>Staatsangehörigkeit</i>	deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1987 – 1991	Grundschule Zorge
1991 – 1993	Orientierungsstufe Bad Sachsa/Walkenried
1993 – 2000	Internatsgymnasium Pädagogium Bad Sachsa
<i>Schulabschluss</i>	Abitur (2000, Note: 2,1)

STUDIUM

01.10. 2000 – 01.10. 2005 Biologie Studium an der TU – Braunschweig

<i>Vordiplom</i>	September 2002, Note: sehr gut
<i>Fächer:</i>	Mikrobiologie, Genetik, Zellbiologie
<i>Diplomprüfung</i>	November / Dezember 2004
<i>Diplomarbeit</i>	Anfertigung von Januar bis Oktober 2005 am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in der Abteilung Genregulation und Differenzierung mit dem Thema „Charakterisierung von sekretierten Faktoren hinsichtlich ihrer Rolle in der Sehnen- und Ligament-differenzierung“
<i>Diplomnote</i>	gut

Seit 15.11.05 Promotion

Seit dem 15. November 2005 arbeite ich im Rahmen meiner Doktorarbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH in Braunschweig.

PUBLIKATIONSLISTE

Referierte Originalarbeiten

1. Winkel, A., Stricker, S., Tylzanowski, P., **Seiffart, V.**, Mundlos, S., Gross, G., Hoffmann, A. (2008): Wnt-Ligand-dependent Interaction of TAK1 (TGF- β -Activated Kinase-1) with the Receptor Tyrosine Kinase Ror2 Modulates Canonical Wnt-Signalling. Cellular Signaling 20(11):2134-44 (2008)

Vorträge auf nationalen und internationalen wissenschaftlichen und Fortbildungstagen

2. Hoffmann, A., **Seiffart, V.**, Lorenz, C., Menzel, H., Thorey, F., Windhagen, H., Gross, G. (2007): Funktionelle Kopplung von Wachstumsfaktoren und anti-inflammatorischen Proteinen an Titanoberflächen. Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien, Hannover
3. Gross, G. Hoffmann, A., **Seiffart, V.**, Shahab, S. (2007): Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation. EU-FR6 GENOSTEM, Barcelona
4. Hoffmann, A., Witte, F., Shahab, S., Winkel, A., **Seiffart, V.**, Peter, S., Gross, G. (2005): Strategies for regenerative mesenchymal stem cell (MSC) therapies of skeletal disorders: Pathways to tendon formation and chimeric BMP-receptors to target MSCs to chondral tissues. 13th Annual Congress European Society of Gene Therapy, Prag
5. Hoffmann, A., Winkel, A., Shahab, S., **Seiffart, V.**, Pelled, G., Gazit, D., Snedeker, J., Müller, R., Gross, G. (2005): The Use of Mesenchymal Stem Cells for Tendon Repair. Executive Committee Meeting, EU-FR6 GENOSTEM, Paris.
6. Hoffmann, A., Winkel, A., Shahab, S., **Seiffart, V.**, Gross, G. (2005): Inflammatory signalling and its cross-talk during tissue development and regeneration. British Society of Rheumatology Annual Meeting "Regenerative Medicine and Gene Therapy", Birmingham

Poster auf nationalen und internationalen wissenschaftlichen Tagungen

7. Shahab, S., Hoffmann, A., **Seiffart, V.**, Winkel, A., Hertwig, F., Colecchia, F., Nuber, U.A., Gross, G. (2007): Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Potential Factors Involved in Tendon/ligament Formation. EU-FR6, Barcelona
8. Hoffmann, A., Shahab, S., **Seiffart V.**, Winkel, A., Ringe, J., Häupl, T., Gross, G. (2007): Strategies for Regenerative Mesenchymal Stem Cell Therapies of Skeletal Disorders: Pathways to Tendon Formation. EU-FR6, Barcelona
9. Hoffmann, A., Witte, F., Shahab, S., Winkel, A., **Seiffart, V.**, Peter, S., Gross, G. (2006): Strategies for regenerative mesenchymal stem cell (MSC) therapies of skeletal disorders: Pathways to tendon formation. EU-FR6, Porto

10. Hoffmann, A., Witte, F., Shahab, S., Winkel, A., **Seiffart, V.**, Peter, S., Gross, G. (2005): Strategies for regenerative mesenchymal stem cell (MSC) therapies of skeletal disorders: Pathways to tendon formation and chimeric BMP-receptors to target MSCs to chondral tissues. ESGT, Prag
11. Hoffmann, A., Witte, F., Shahab, S., Winkel, A., **Seiffart, V.**, Hertwig, F., Nuber, U., Gross, G. (2005): Strategies for regenerative mesenchymal stem cell (MSC) therapies of skeletal disorders: Pathways to tendon formation. EMPA Workshop, St. Gallen
12. Hertwig, F., Hoffmann, A., Shahab, S., Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Winkel, A., Witte, F., **Seiffart, V.**, Gross, G., Nuber, U. (2005): Gene Expression Analysis of a Stable Mesenchymal Progenitor Line (C3H10T $\frac{1}{2}$ -BMP2/SMAD8-L+MH2) Differentiating into Tendon-Forming Cells. 3rd Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, San Francisco